

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211019001

杨雨桐, 周宏瑞, 杨晓波, 等. 双酚 A 促进粪肠球菌中信息素调控质粒 pCF10 介导的耐药基因接合转移[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(1): 191-202  
Yang Y T, Zhou H R, Yang X B, et al. Bisphenol A promotes conjugative transfer of antibiotic resistance genes mediated by pheromone-responsive plasmid in *Enterococcus faecalis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(1): 191-202 (in Chinese)

## 双酚 A 促进粪肠球菌中信息素调控质粒 pCF10 介导的耐药基因接合转移

杨雨桐, 周宏瑞, 杨晓波, 王尚, 薛斌, 李辰宇, 赵辰, 张曦, 谌志强, 王景峰, 邱志刚\*

军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050

收稿日期: 2021-10-19 录用日期: 2022-01-04

**摘要:** 粪肠球菌是一种在自然水体中广泛存在的革兰氏阳性细菌。信息素调控质粒介导的接合转移是造成粪肠球菌耐药基因快速扩散的重要方式。双酚 A 是一种内分泌干扰物, 因其在工业中大量应用造成其在水环境中的广泛分布。本文以信息素调控质粒中比较有代表性的 pCF10 质粒作为研究对象, 研究了双酚 A 对粪肠球菌中耐药基因接合转移的影响, 证实了双酚 A 可以促进 pCF10 质粒介导的耐药基因接合转移, 且这一结果同双酚 A 作用浓度和作用时间相关。双酚 A 影响耐药基因的扩散, 是通过促进编码正调控信息素的 *ccfA* 基因表达实现的。本文旨在深入理解双酚 A 影响抗生素抗性基因扩散的环境行为, 为耐药基因控制及双酚 A 环境效应的评估提供理论支持。

**关键词:** 双酚 A; 粪肠球菌; 接合转移; 耐药基因; 信息素调控质粒

文章编号: 1673-5897(2022)1-191-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Bisphenol A Promotes Conjugative Transfer of Antibiotic Resistance Genes Mediated by Pheromone-responsive Plasmid in *Enterococcus faecalis*

Yang Yutong, Zhou Hongrui, Yang Xiaobo, Wang Shang, Xue Bin, Li Chenyu, Zhao Chen, Zhang Xi, Shen Zhiqiang, Wang Jingfeng, Qiu Zhigang\*

Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medicine, Chinese Academy of Military Science, Tianjin 300050, China

Received 19 October 2021 accepted 4 January 2022

**Abstract:** Gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) is widespread in natural water environments. The conjugative transfer mediated by pheromone-responsive plasmid is one important way of the rapid spread of antibiotic resistance genes in *E. faecalis*. As an endocrine disruptor, bisphenol A (BPA) is present in high levels in the aqueous environment because of its wide use in industry. In this paper, we investigated the effect of BPA on the conjugative transfer of antibiotic resistance genes mediated by a representative pheromone-responsive plasmid pCF10 plasmid in *E. faecalis*. The results showed that BPA could promote pCF10 plasmid-mediated conjugative transfer of antibiotic resistance genes, and the promotion effect was correlated with concentration and time of BPA

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42177414); 天津市自然科学基金重点项目(17JCZDJC39100)

第一作者: 杨雨桐(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为耐药基因转移, E-mail: yangyutong0223@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhigangqiu99@gmail.com

action. BPA could affect the spread of antibiotic resistance genes by promoting the expression of the *ccfA* gene, which encodes a positively regulated pheromone. The study could provide an in-depth understanding of the environmental behavior of BPA in affecting the spread of antibiotic resistance genes, and provide theoretical support for the control of antibiotic resistance genes and the assessment of the environmental effects of BPA.

**Keywords:** bisphenol A; *Enterococcus faecalis*; conjugative transfer; antibiotic resistance genes; pheromone-responsive plasmid

粪肠球菌是一种在自然环境中广泛存在的革兰氏阳性细菌。由于其特殊的耐药机制及高频率的耐药基因转移方式,导致了环境中耐药粪肠球菌的广泛传播。抗生素抗性基因在细菌中的广泛传播,已严重威胁到人类的健康<sup>[1-2]</sup>。基因在细菌间的水平转移主要分为转化、转导和接合3种方式,其中接合是指通过细菌间接触从而转移质粒的方式,其转移质粒的频率和效率最高<sup>[3]</sup>。在肠球菌属的接合转移中存在一类信息素应答质粒介导的接合转移,其接合转移频率高达 $10^{-1}$ (接合子数量/供体菌数量),且携带抗生素抗性基因,使得耐药现状更加严峻<sup>[4-5]</sup>。信息素调控质粒编码了一种利用多肽信息素作为信号分子的特殊接合转移机制。粪肠球菌中的信息素通常是由7~8个氨基酸组成的多肽,这种多肽在无质粒的细菌细胞(受体)中产生和释放,并在含有质粒的细菌细胞(供体)中诱导质粒发生转移<sup>[6-9]</sup>。

医院和养殖场废水排放等人类活动,自然水体可能被抗生素污染<sup>[10]</sup>,而抗生素残留给细菌带来的选择性压力是抗生素抗性基因的广泛传播的原因之一<sup>[11]</sup>。但研究者证明非抗生素因素(如纳米材料、重金属离子和消毒剂等)也能够造成耐药基因广泛传播<sup>[12-14]</sup>。

双酚 A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane; CAS:80-05-7)是一种自然水体中常见的环境雌激素类污染物。双酚 A 是世界上生产量最高的化学原料之一<sup>[15]</sup>,工业上常使用双酚 A 作为单体合成环氧树脂等聚合物,用于制造多种生活用品<sup>[16]</sup>。双酚 A 的核心结构类似于天然的 $17\beta$ -雌二醇,因此具有雌激素效应,经广泛证实是一种内分泌干扰物<sup>[17-20]</sup>。强酸、强碱和高温等条件会加剧连接双酚 A 单体的酯键的水解,使得双酚 A 单体通过垃圾填埋场渗出液、工业废水等途径进入环境<sup>[19, 21-22]</sup>。在自然水体中双酚 A 的含量也相对较高,通常可用 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 来计量<sup>[23]</sup>。双酚 A 的化学构象及穿膜方式与信息素类似<sup>[24]</sup>,又与携带抗生素抗性基因的细菌在空间上产生交集,如果其能够促进耐药基因的接合转移,将使耐药基因扩散形势更加严峻。

本文选择了最具代表性的信息素调控质粒 pCF10 质粒作为研究对象,通过建立肠球菌间耐药基因接合转移模型研究了双酚 A 浓度及作用时间对 pCF10 质粒接合转移的影响规律;并利用荧光定量 PCR 技术测定了双酚 A 对调控信息素产生的相关基因表达的影响,初步揭示双酚 A 促进 pCF10 质粒接合转移的机制。本研究为全面了解环境中双酚 A 的生物效应提供了新的科学依据,也为环境中耐药基因扩散防控和生态安全提供理论指导。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 菌株、质粒培养条件及接合转移实验

本研究中使用的细菌均来源于粪肠球菌 OG1RF(ATCC47077)。信息素调控质粒 pCF10<sup>[25]</sup>携带编码四环素抗性的抗性基因,由美国明尼苏达大学 Gary Dunny 教授惠赠。供体菌 OG1RF(pCF10)为肠球菌 OG1RF 携带 pCF10 质粒,能够耐受 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 四环素;受体菌 OG1RS 是肠球菌 OG1RF 经本实验室诱导获得链霉素抗性的肠球菌,能够耐受 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素;接合子 OG1RS(pCF10)为受体菌 OG1RS 获得 pCF10 质粒,能够耐受 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 四环素和 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素。供体菌 OG1RF (pCF10)和受体菌 OG1RS 分别接种于含有对应浓度抗生素的脑心浸出液肉汤培养基(BHI)(北京酷来搏科技有限公司,中国)中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 10 h 后将菌液按 1:10 的比例转接至新鲜的含相应抗生素的 BHI 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中 5 h 生长至对数期。在冷冻离心机(5408R, Eppendorf, 德国) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }629\text{ g}$ 、5 min 条件下,利用磷酸缓冲盐溶液(PBS,北京索莱宝科技有限公司,中国)离心洗涤 3 次后用 LB 肉汤培养基(Becton, Dickinson 公司,美国)重悬菌液并调整 OG1RF(pCF10)和 OG1RS 菌液浓度至 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随后将供、受体菌按照 1:1 的比例混合组成接合转移体系,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养一定时间后,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液利用含 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(EDTA)(纯度 $\geq 99.5\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司,中国)的 PBS 缓冲液进行梯度稀释。取稀释 2

个梯度和 3 个梯度的 10  $\mu\text{L}$  菌液分别滴在含有 0.01  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  四环素和 3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的链霉素的 BHI 琼脂培养基上筛选接合子;取稀释 4 个梯度和 5 个梯度的 10  $\mu\text{L}$  菌液滴在只含有 3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  链霉素或只含有 0.01  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  四环素的 BHI 琼脂培养基上分别筛选受体菌或供体菌。待菌液被充分吸收后,倒置放入 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱,培养 36 h 左右计数形成的单菌落。

### 1.2 双酚 A 浓度对 pCF10 接合转移影响实验

双酚 A(纯度  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich 公司,美国)溶于二甲基亚砜(DMSO)(纯度  $\geq 99.7\%$ , Sigma-Aldrich 公司,美国),制成浓度为 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液。按照 1.1 中制备接合转移体系的方法制备 7 份体积相同接合菌液,其中 5 份分别加入浓度为  $1\times 10^{-2}$ 、 $1\times 10^{-1}$ 、1、10 和 100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A,其余 2 份分别加入等体积的灭菌双蒸水和终浓度为  $1.1\times 10^{-2}$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DMSO 作对照。菌液混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱培养 4 h 后,按照 1.1 中的方法分别计数供体菌、受体菌和接合子数量。本实验至少重复 3 次。

### 1.3 双酚 A 作用时间对 pCF10 接合转移影响实验

按照 1.1 中的方法制备 3 份接合转移菌液,其中一份加入终浓度为 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A,另外 2 份分别加入等体积的灭菌双蒸水和 DMSO 作为对照。同时制备供体菌和受体菌菌液,按照以上方法加入双酚 A、双蒸水和 DMSO,进行双酚 A 对供、受体菌生长的影响实验。所有菌液混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱培养,分别在 1、2、4、6 和 8 h 取出 100  $\mu\text{L}$  菌液按照 1.1 中的方法分别计数供体菌、受体菌和接合子数量。本实验至少重复 3 次。

### 1.4 活性氧检测

按照 1.1 中的方法制备供体菌、受体菌和接合转移菌液各 3 份。在供、受体菌和接合转移菌液中各取一份加入 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A 处理 4 h,另外 2 份加入灭菌双蒸水和活性氧检测试剂盒提供的阳性对照 Rosup 分别作为阴性对照和阳性对照。取双酚 A 和 Rosup 处理 4 h 后的接合转移菌液各 100  $\mu\text{L}$  进行接合子计数,剩余菌液用于测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量。ROS 的测定参照活性氧检测试剂盒(CA1410,北京索莱宝科技有限公司,中国)的使用说明进行。具体步骤如下:1 mL 细胞悬液加入 1  $\mu\text{L}$ (终浓度为 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )新鲜制备的 DCFH-DA 荧光探针。混合物在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下静置 20 min,每 5 min 振荡颠倒混匀一次。在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、4 629

$\text{g}\cdot 5 \text{ min}$  条件下,用 PBS 离心清洗 3 次以去除多余的荧光探针。使用酶标仪(SpectraMax M5, Molecular Devices 公司,美国)在激发光 488 nm、发射光 525 nm 测定荧光值。

### 1.5 细菌总 RNA 的提取

按照 1.1 中的方法制备接合转移菌液,加入终浓度 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A(等体积的双蒸水作为对照)在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱培养 4 h 后,迅速回收细菌细胞,置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存备用。解冻后在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、9 700  $\text{g}$ 、2 min 条件下离心完全去除上清,细菌沉淀用于提取总 RNA。使用细菌总 RNA 提取试剂盒(DP430,天根生化科技有限公司,中国)提取细菌总 RNA,具体操作过程按照试剂盒说明书进行。利用微量分光光度计(ND-ONE-W, Thermo Fisher 公司,美国)测定 RNA 浓度后,利用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(KR116-02,天根生化科技有限公司,中国)将总 RNA 反转录合成 cDNA。反转录的操作按照试剂盒说明书进行,所用的引物为试剂盒提供的 FQ-RT Primer Mix。cDNA 置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存,用于后面的荧光定量 PCR 实验。

### 1.6 细菌基因组 DNA 的提取

按照 1.1 中的方法制备接合转移菌液,加入终浓度 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A(等体积的双蒸水作为对照)在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱培养 4 h 后,迅速回收细菌细胞。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302,天根生化科技有限公司,中国)分别提取双酚 A 处理组和对照组的细菌基因组 DNA。提取的 DNA 置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存,用于后面的荧光定量 PCR 实验。

### 1.7 荧光定量 PCR 实验

荧光定量 PCR 实验中所用的引物利用软件 DNASTAR V7.1 进行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。相关基因引物序列及扩增产物片段长度如表 1 所示。

荧光定量 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 SYBR Green 预混液(A25742, Thermo Fisher 公司,美国) 10  $\mu\text{L}$ ,上下游引物(终浓度为  $5\times 10^{-2}$   $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,双蒸水 7  $\mu\text{L}$ 。每个样品至少做 3 个复孔。荧光定量 PCR 实验在美国 Bio-Rad 公司型号为 CFX96 的荧光定量 PCR 仪上完成,所用软件为 Bio-Rad CFX Maestro。PCR 的扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5min,然后进行 40 个循环的 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s 和 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s。最后

进行熔解曲线测定,程序为:65 °C 5 s,升高至95 °C 变性 DNA 产物。

利用绝对定量的方法计算样品目的基因拷贝值,以内参基因 16S rRNA 校正 PCR 模板的拷贝数。研究中的基因扩增标准曲线如图 1 所示。

### 1.8 信息素的测定方法

按照 1.1 中方法制备接合菌液 2 份,其中 1 份

加入终浓度为  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的双酚 A,另 1 份加入等体积的双蒸水作为对照。接合菌液放置于 37 °C 恒温恒湿培养箱中培养 4 h,迅速取出并放置于冰上 20 min。离心机在  $12\ 857 \text{ g}$ 、4 °C 条件下离心 10 min,保留上清液,然后用  $0.22 \mu\text{m}$  孔径的一次性针头式滤器(SLGP033RB, Millipore 公司,美国)过滤上清。取  $800 \mu\text{L}$  过滤后的上清液加入  $100 \mu\text{L}$  乙腈

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

目的基因 Primer name	引物序列 Sequence of primers	产物长度/bp Length of product/bp
<i>ccfA</i> <sup>[8]</sup>	F: 5' -AGATATACGAAGGCCCGCTGAA-3' R: 5' -AATTAGTTATCCGCTGCTCCTGA-3'	243
<i>prgQ</i> <sup>[26]</sup>	F: 5' -TATAGGAGGGGTGTAATGAAAAC-3' R: 5' -CCGTCCTATGGCAGTCG-3'	143
<i>tetM</i> <sup>[27]</sup>	F: 5' -GATTTGGCGGCACTT-3' R: 5' -CGCACCTCTACTACAAA-3'	294
16S rRNA <sup>[28]</sup>	F: 5' -GCGGCGTGCTAATACA-3' R: 5' -CCGCGGGTCCATCC-3'	219

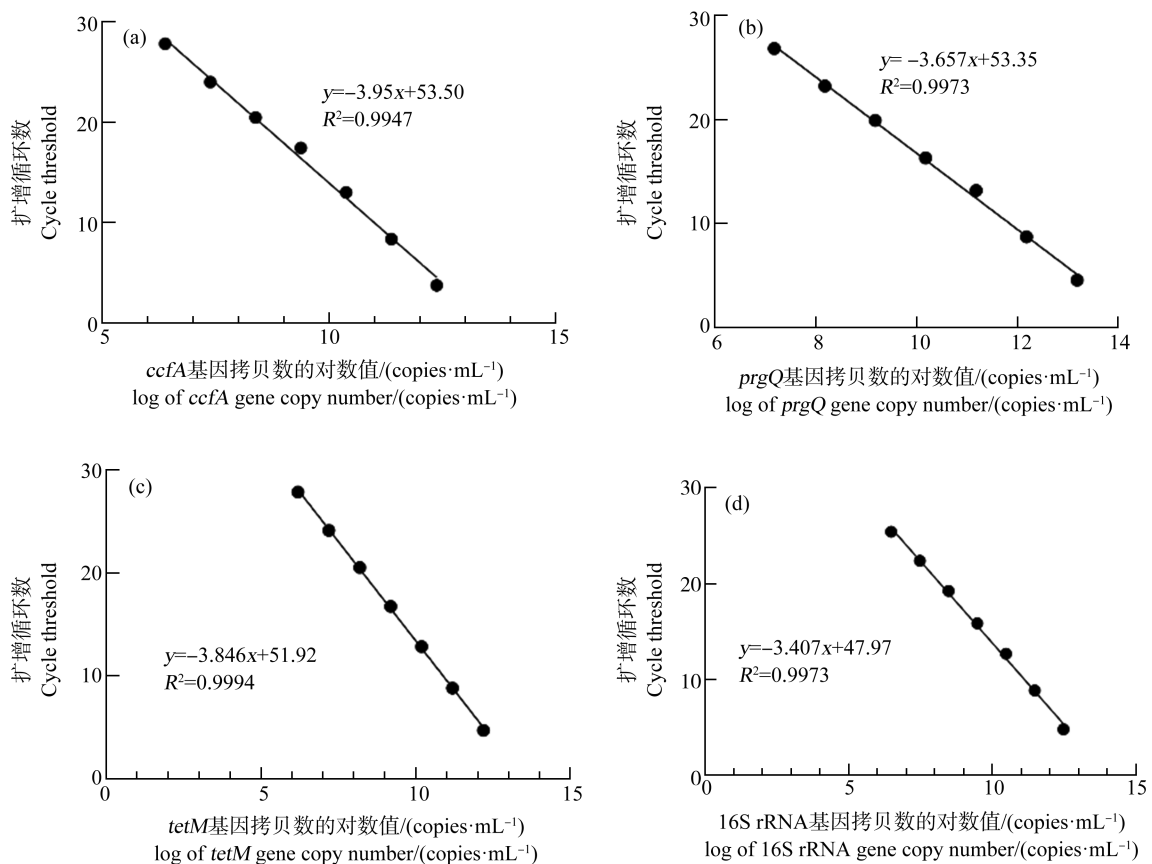


图 1 不同基因拷贝数的对数值与扩增循环数的对应关系标准曲线

Fig. 1 Standard curve corresponding to the log of the copy number of each primer gene and cycle threshold

(纯度 $\geq 99.9\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司,中国)和  $100\ \mu\text{L}$  氢氧化铵(纯度 $\geq 25\%$ ,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,中国),室温  $1\ 400\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  混匀  $15\ \text{min}$  后,在  $21\ ^\circ\text{C}$ 、 $20\ 000\ \text{g}$  条件下离心  $15\ \text{min}$ 。取  $600\ \mu\text{L}$  上清液与  $600\ \mu\text{L}$   $10\%$  氢氧化铵水溶液( $V:V$ )混合,短暂离心后使用 C18 固相萃取柱(广州翔博生物科技有限公司,中国)进行萃取。首先分别将  $5\ \text{mL}$  乙腈和  $5\ \text{mL}$  水通过固相萃取柱,使其活化。然后将  $1\ \text{mL}$  样品通过固相萃取柱,依次用  $5\ \text{mL}$   $5\%$  乙腈水溶液( $V:V$ )、 $0.75\ \text{mL}$  和  $0.5\ \text{mL}$   $30\%$  乙腈水溶液( $V:V$ )进行洗脱,收集第 2 次和第 3 次洗脱样品在液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(H CLASS\_XEVO TQ-S micro, Waters 公司,美国)上进行检测。

超高效液相条件:C18 ( $1.7\ \mu\text{m}$ ,  $2.1\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}$ , Waters 公司,美国)色谱柱,流动相:乙腈(A), $0.1\%$  甲酸(纯度 $\geq 99.5\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司,中国)、 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵的水溶液(B)。体积流量  $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温  $35\ ^\circ\text{C}$ ,进样量  $5\ \mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序: $0\sim 0.5\ \text{min}$ , $96\%\ \text{A}$ ; $0.5\sim 1.5\ \text{min}$ , $40\%\ \text{A}$ ; $1.5\sim 2.5\ \text{min}$ , $40\%\ \text{A}$ ; $2.5\sim 3\ \text{min}$ , $96\%\ \text{A}$ ; $3\sim 5\ \text{min}$ , $96\%\ \text{A}$ 。

质谱条件:选择 ESI 正离子模式,其余条件如表 2 所示。

表 2 质谱条件参数

Table 2 Mass spectrum parameters

条件 Conditions	参数 Parameters
离子源温度/ $^\circ\text{C}$ Source temperature/ $^\circ\text{C}$	150
去溶剂流速/ $(\text{L}\cdot\text{h}^{-1})$ Desolvent rate/ $(\text{L}\cdot\text{h}^{-1})$	1 000
去溶剂温度/ $^\circ\text{C}$ Desolvent temperature/ $^\circ\text{C}$	500
母离子质荷比 Parent $m/z$	790.8149
子离子质荷比 Daughter $m/z$	314.3200, 409.3026
锥孔电压/V Cone energy/V	16, 18
碰撞电压/V Collision energy/V	36, 26

### 1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行数据处理,并利用 SPSS 26.0 软件对多因素影响接合子数量、测定 ROS 水平的相关实验数据进行单因素方差分析,对测定基因转录水平和信息素含量等相关实验数据进行  $t$  检验分析, $P<0.05$  被认为有显著的统计学差异。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 双酚 A 浓度对粪肠球菌耐药基因接合转移的影响

双酚 A 浓度对粪肠球菌耐药基因接合转移的影响如图 2 所示。供体菌和受体菌初始浓度均为  $1\times 10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,接合转移  $4\ \text{h}$  条件下,自然状态下形成接合子数量约为  $6.61\times 10^5\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Control 组)。同时在  $1.1\times 10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DMSO 作用下,接合子数量为  $6.27\times 10^5\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,与空白对照组相比无统计学差异(one-way ANOVA,  $P>0.05$ ),说明溶剂 DMSO 对 pCF10 质粒介导的接合转移无影响。接合体系在  $1\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  双酚 A 作用  $4\ \text{h}$  后接合子数量约为  $1.37\times 10^6\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,可达对照组的 2 倍左右。在  $1\times 10^{-1}\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1\times 10^{-2}\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A 作用下,接合体系中接合子的数量也有明显的提升( $1.12\sim 1.19\times 10^6\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。  $1$ 、 $10^{-1}$  和  $10^{-2}\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双酚 A 显著地提高了接合子的数量,经统计学分析具有显著性差异(one-way ANOVA,  $P<0.05$ )。而在  $10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的双酚 A 作用下,接合子数量在  $6.11\times 10^5\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,与对照组相比无明显差异(one-way ANOVA,  $P>0.05$ )。这一结果表明,在  $1\times 10^{-2}\sim 1\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度范围内,双酚 A 对 pCF10 质粒介导的接合转移具有促进作用,并且这一影响与双酚 A 浓度相关。

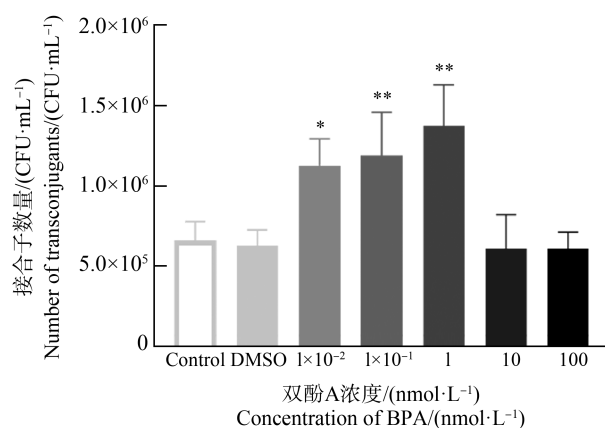


图 2 双酚 A (BPA) 浓度对接合转移的影响  
(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ )

注:DMSO 表示该组为加入终浓度为  $1.1\times 10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的二甲基亚砜(DMSO)的对照组。

Fig. 2 Effect of bisphenol A (BPA) concentration on conjugative transfer (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

Note: DMSO indicates that the group added with a final concentration of  $1.1\times 10^{-2}\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a control.

为了进一步确定双酚 A 能够促进接合转移体系中耐药基因 *tetM* 丰度的增加,利用荧光定量 PCR 的方法测定了 *tetM* 基因在接合转移前后的丰度。如图 3 所示,在接合开始时实验组与对照组的 *tetM* 基因相对丰度均在  $5 \times 10^{-3}$  左右。当接合时间达到 4 h 时,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  双酚 A 作用后的接合体系中 *tetM* 基因相对丰度可达  $1.2 \times 10^{-1}$  左右,而自然状态下发生接合转移的体系中 *tetM* 基因相对丰度仅为  $8 \times 10^{-2}$  左右,经统计学分析具有显著性差异 ( $t$ -test,  $P < 0.01$ )。在双酚 A 作用下,耐药基因 *tetM* 的相对基因丰度可提高 1.5 倍。这一结果表明,双酚 A 可以通过接合转移的方式使耐药基因的相对丰度显著提高。

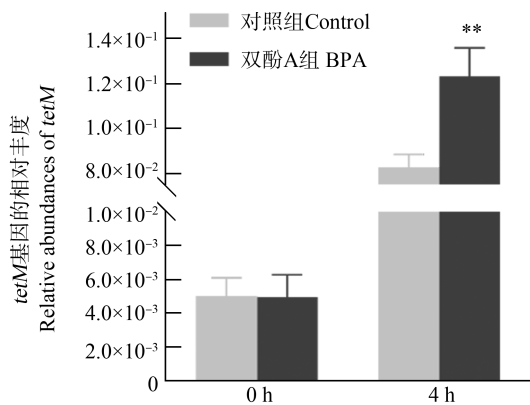


图3 双酚 A 作用下, *tetM* 基因相对丰度的变化 (\*\* $P < 0.01$ )

Fig. 3 Changes in the relative abundance of *tetM* under the effect of BPA (\*\* $P < 0.01$ )

## 2.2 双酚 A 作用时间对粪肠球菌耐药基因接合转移的影响

双酚 A 作用时间对粪肠球菌耐药基因接合转移的影响如图 4 所示。在自然状态下 (Control 组), pCF10 质粒的接合子数量在接合时间 0 ~ 4 h 内随作用时间的延长而增加,在接合 4 h 时接合子数量在  $9.3 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右,达到最高点。在接合 4 h 后,接合子数量呈现下降趋势。同时在  $1.1 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DMSO 作用下,在作用时间 1 ~ 8 h 内接合子数量与空白对照组相比经统计学分析无明显差异 (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ),说明溶剂 DMSO 对 pCF10 质粒介导的接合转移无显著影响。在  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  双酚 A 作用于接合体系 4 ~ 6 h 后,接合子数量相较于空白对照组有明显的增加,其中双酚 A 作用 4 h 后,接合子数量可由  $8.6 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  升至  $1.5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,经统计学分析具有显著性差异

(one-way ANOVA,  $P < 0.05$ )。结果表明,在双酚 A 作用下,接合子数量随时间的变化趋势与自然状态下类似,均呈现出随着作用时间的延长,接合子数量先增加后降低的规律。接合时间在 4 ~ 6 h 时,双酚 A 对 pCF10 质粒介导的接合转移具有促进作用,且在接合 4 h 时,双酚 A 对接合转移的促进作用最明显。

通过进一步观察供受体菌的生长情况可以发现 (图 5),接合转移过程中双酚 A 作用下的供受体菌数量与对照组相比均无明显变化。这一结果表明,双酚 A 不是通过影响供受体菌数量从而影响接合子数量的。

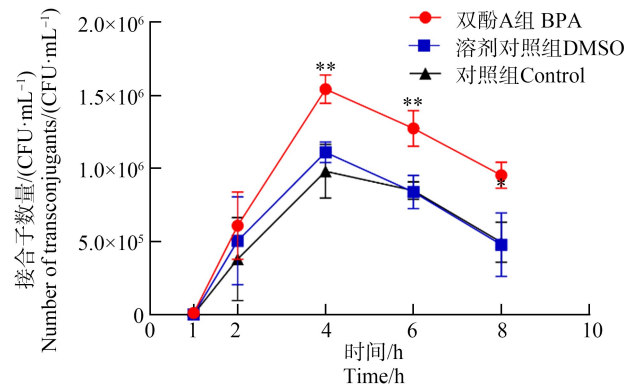


图4 双酚 A 作用下,接合时间对接合转移的影响 (\*\* $P < 0.01$ )

Fig. 4 Effect of treatment time on conjugative transfer in the presence of BPA (\*\* $P < 0.01$ )

## 2.3 双酚 A 对细菌氧化应激的影响

许多研究表明,ROS 的产生会促进 RP4、RK2 等质粒的接合转接<sup>[12, 29]</sup>,但是双酚 A 是否也是通过促使肠球菌产生 ROS 进而影响 pCF10 质粒的接合转移还未可知。本文研究了双酚 A 对粪肠球菌 ROS 产生的影响及 ROS 的产生对 pCF10 质粒接合转移的影响。研究结果表明,在作用 4 h 后双酚 A 虽然能够显著促进 pCF10 质粒接合转移,但在该时刻供、受体菌和接合体系细菌细胞中的 ROS 含量与对照组相比均无明显差异 (图 6(a), one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ),说明双酚 A 促进 pCF10 接合转移过程并未影响细菌的 ROS 的产生。为了进一步确证双酚 A 对本接合转移体系中 ROS 产生的影响,我们将其作用时间延长至 24 h,发现其作用下 ROS 水平与对照组比较有了明显的升高 (图 6(b)),但是我们使用 ROS 阳性对照 Rosup 处理接合细菌 4 h 后进行接合子计数 (图 6(c)) 后发现, Rosup 处理组的接合

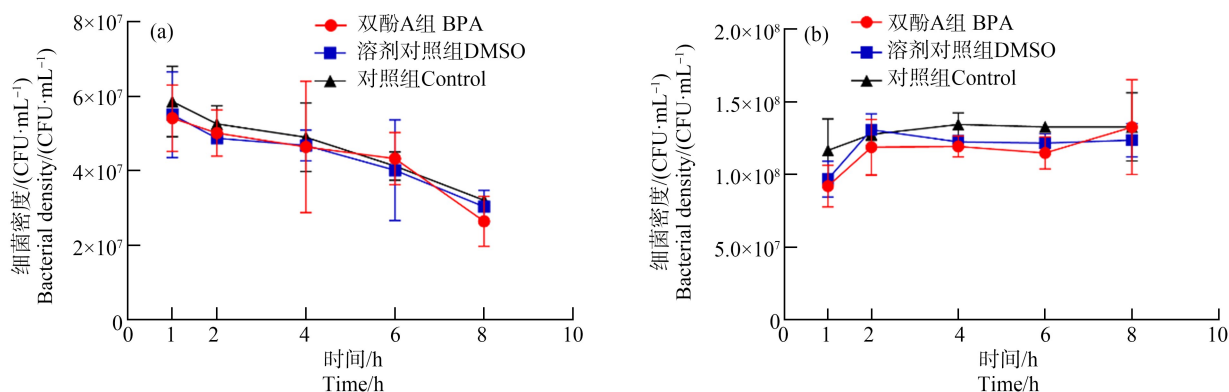


图 5 双酚 A 对接合转移过程中供体菌的影响 (a) 和双酚 A 对接合转移过程中受体菌的影响 (b)  
Fig. 5 Effect of BPA on donor bacteria during conjugative transfer (a) and effect of BPA on receptor bacteria during conjugative transfer (b)

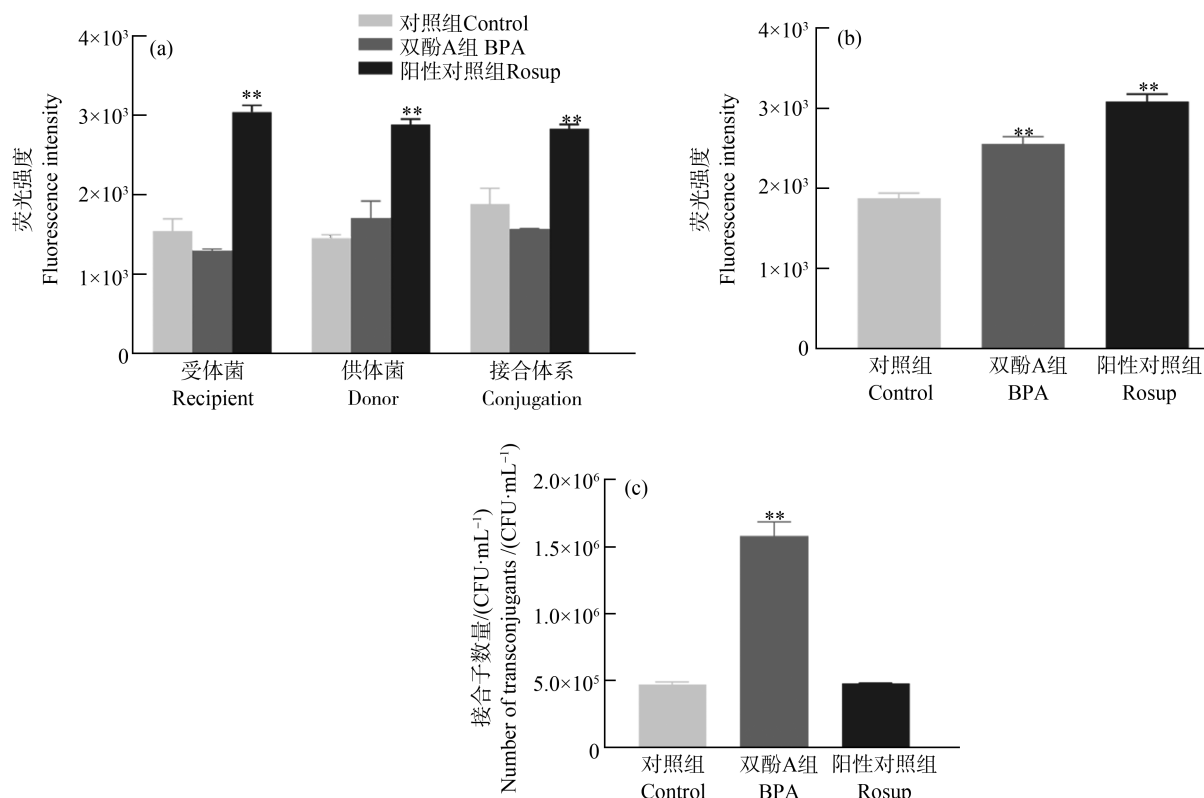


图 6 双酚 A 对活性氧 (ROS) 水平及接合转移的影响

注:(a)接合 4 h 后受体菌、供体菌及接合体系中的 ROS 水平;(b)接合 24 h 后接合体系中的 ROS 水平;  
(c)双酚 A 及 ROS 阳性对照 Rosup 对接合转移的影响; \*\**P*<0.01。

Fig. 6 Effect of BPA on reactive oxygen species (ROS) levels and conjugative transfer

Note: (a) ROS levels in recipient bacteria, donor bacteria, and conjugation after 4 h of conjugation initiation; (b) ROS levels in conjugation after 24 h of conjugation initiation; (c) Effect of BPA and ROS control Rosup on conjugative transfer; \*\**P*<0.01.

子数量相较于对照组并无明显差异(约在  $5 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>)。这些结果表明,双酚 A 促进粪肠球菌中的耐药基因接合转移不是通过影响细菌产生氧化应激这一途径实现的。

## 2.4 双酚 A 对信息素编码基因表达和信息素生成的影响

pCF10 系统中, *ccfA* 基因编码正调控信息素 cCF10<sup>[30]</sup>, *prgQ* 基因编码负调控信息素 iCF10<sup>[26]</sup>, 2

种信息素互为拮抗作用,更高效地调控接合转移过程。我们研究了双酚 A 对调控信息素编码基因 *ccfA* 和 *prgQ* 的 mRNA 表达的影响。在双酚 A 的作用下, *ccfA* 基因的表达量由对照组的  $3.5 \times 10^{-3}$  copies  $\cdot$  (16S) $^{-1}$  升高至  $6 \times 10^{-3}$  copies  $\cdot$  (16S) $^{-1}$ , *prgQ* 基因的表达量由对照组的  $1.5 \times 10^{-2}$  copies  $\cdot$  (16S) $^{-1}$  升高至  $2.5 \times 10^{-2}$  copies  $\cdot$  (16S) $^{-1}$ , 均具有显著性差异 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ) (图 7)。我们进一步检测了接合体系

上清液中信息素 cCF10 的含量,实验结果表明,在双酚 A 作用下,接合体系上清液中信息素浓度由  $0.33 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  提高至  $0.84 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 升高了 2 倍左右 (图 8)。在双酚 A 作用下,翻译后水解形成成熟的信息素 cCF10 的浓度显著升高,这也与 *ccfA* 基因的转录水平显著提高相对应。双酚 A 通过调控生成信息素基因的 mRNA 表达,进而促进信息素的生成可能是双酚 A 促进 pCF10 质粒接合转移的重要机制。

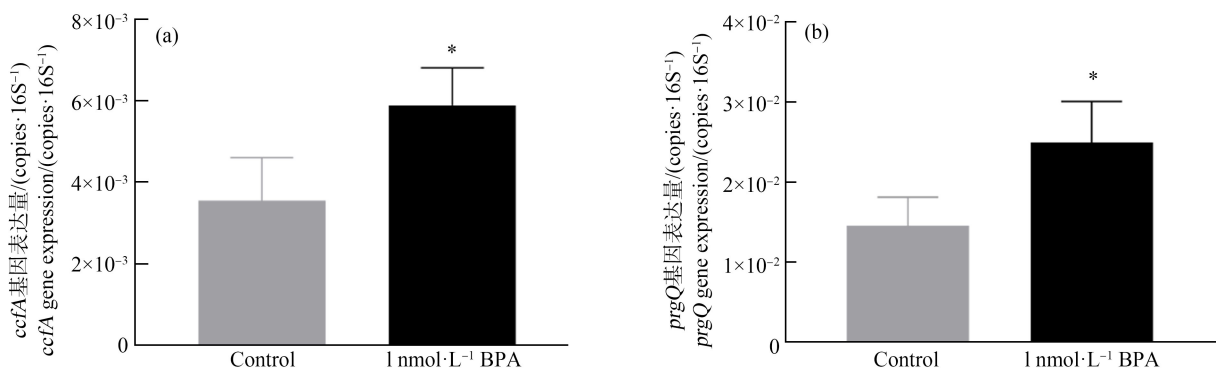


图 7 双酚 A 对信息素编码基因表达的影响

注: \* $P < 0.05$ 。

Fig. 7 Effect of BPA on the expression of pheromone-encoded genes

Note: \* $P < 0.05$ .

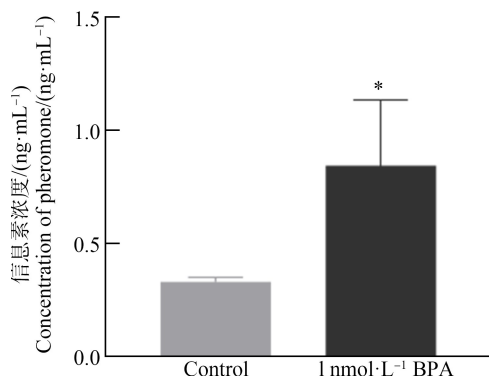


图 8 双酚 A 作用下,接合体系上清液中信息素含量的变化

注: \* $P < 0.05$ 。

Fig. 8 Changes in the pheromone concentration in the supernatant of the conjugative system under the effect of BPA

Note: \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论 (Discussion)

内分泌干扰物双酚 A 在环境中的污染问题一直广受关注,其在自然水体中大量分布<sup>[31-32]</sup>,对人体健康构成的严重威胁也不容小觑<sup>[21,33-34]</sup>。尤其是双酚 A 对生殖健康的影响已有不少研究报道<sup>[35-36]</sup>,但关于双酚 A 对耐药基因水平转移的影响和机制却

鲜有报道。粪肠球菌不但具有较强的天然耐药性<sup>[37]</sup>,且极易被诱导而发生高效的耐药基因水平转移<sup>[38]</sup>。本文揭示了耐药基因水平转移的新途径,同时也提示我们关注环境污染物的生物效应形式和机制,重新认识其在环境中的作用和行为,对生态安全领域具有重要意义。

双酚 A 对 pCF10 质粒介导的接合转移具有促进作用且与双酚 A 浓度相关(图 2),即在一定浓度范围内具有促进作用。当双酚 A 浓度在  $1 \times 10^{-2} \sim 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内时,双酚 A 具有促进 pCF10 质粒接合转移的效应,且在  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时促进效果最强。双酚 A 浓度影响细胞生理活动的研究不胜枚举,如双酚 A 影响精原细胞增殖时,剂量-效应曲线呈倒 U 型,当双酚 A 浓度超过特定范围时促进细胞增殖的效应显著下降<sup>[39]</sup>。有研究报道,一些微生物可以通过活跃的化学外排或化学降解抵抗因双酚 A 暴露浓度增加而升高的毒性<sup>[40]</sup>。在本研究中出现剂量-效应曲线为倒 U 型的现象推测是由于高浓度双酚 A 作用下,细菌的外排能力或降解能力已达到极限。过量的双酚 A 对细菌产生毒性,从而影响了细菌接合转移的能力。



细菌对抗生素的耐药性通常是通过可移动的遗传元件如接合质粒或接合转座子等获得的,使接合转移发生在病原菌或共生菌之间<sup>[41-42]</sup>。在 pCF10 质粒中,四环素抗性基因 *tetM* 存在于接合转座子 Tn916 中<sup>[43]</sup>。通过基因的水平转移,四环素抗性基因可以随转座子扩散到其他细菌中,使其也对抗生素产生耐药性。在双酚 A 作用下,由粪肠球菌组成的接合体系中耐药基因的相对丰度显著提升(图 3),意味着双酚 A 能够使体系中含有耐药基因 *tetM* 的细菌与细菌总量的比例从 8% 提高到 >1%。粪肠球菌作为广泛分布于人体肠道内,且易于在环境中存活的指示微生物,已被证明其存在与自然水体游泳者患胃肠疾病相关<sup>[44]</sup>。而每年全世界消费双酚 A 的体量也不容忽视,在自然水环境中,双酚 A 含量一般在  $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内<sup>[21, 23, 45]</sup>,与本研究中双酚 A 影响耐药基因转移的浓度范围基本重合。当粪肠球菌与双酚 A 在时间和空间上发生重叠,便极大地增加了耐药基因扩散的环境风险,对人类健康造成严重影响,也对生态安全构成了极大的威胁。

双酚 A 对 pCF10 质粒接合转移的促进作用与双酚 A 作用下的接合时间相关(图 4)。在双酚 A 作用下,接合时间为 4 h 时,接合子数量达到最高点。当接合时间超过 4 h 后,接合子数量随时间的延长逐渐下降。多肽信息素属于革兰氏阳性菌的群体感应信号分子<sup>[46]</sup>,胞外的信号分子随着培养时间的延长而累积,从而产生群感效应以调节细菌的群体行为<sup>[47]</sup>。接合子数量在达到接合终点后随时间推移而降低,我们分析该现象是由于群感效应中细胞自身的程序性自杀机制激活了细胞死亡,接合子数量逐渐回归初始水平。

细菌细胞中的 ROS 主要包括超氧阴离子自由基( $\text{O}_2 \cdot^-$ )、 $\cdot\text{OH}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[48]</sup>。当 ROS 含量超过自身可以承载的水平时就会引起细菌的氧化应激,从而损害细菌的各种生物大分子,例如核酸、脂质和蛋白质等<sup>[49]</sup>。目前有研究证明了细菌耐药性与 ROS 的产生存在一定相关性。研究者发现 ROS 可以造成细菌 DNA 的突变或筛选出抗氧化能力较强的菌株,进而增加耐药菌株产生的概率<sup>[50-51]</sup>。在细菌接合转移的相关研究中,也有很多研究者认为细菌产生氧化应激是其接合转移升高的原因之一<sup>[12, 14]</sup>。因细菌中 ROS 主要在细胞膜上产生,过量的 ROS 会对细胞膜蛋白造成影响,继而改变其通透性,使得质

粒的转移增加<sup>[52-53]</sup>。大量实验证明,在 RP4 质粒介导的接合转移体系中,多种影响因素如纳米材料<sup>[12]</sup>、非营养性甜味剂<sup>[54]</sup>以及非阿片类止痛药<sup>[55]</sup>等都可以通过产生 ROS,诱导细菌的氧化应激,从而促进质粒在革兰氏阴性细菌大肠杆菌中的接合转移。本研究中双酚 A 作用 4 h 时未引起粪肠球菌中 ROS 含量升高(图 6(a)),可能是由于其作为革兰氏阳性细菌细胞壁较厚,双酚 A 刺激在在短时间内未能引起细菌细胞反应。也有实验证明双酚 A 作用 24 h 后可以刺激细胞中 ROS 的产生,引起氧化应激<sup>[56]</sup>。本文通过实验证明双酚 A 作用于接合体系 24 h 后可以引起细菌细胞内 ROS 含量的升高(图 6(b)),但由于接合转移反应较为迅速,还未达到产生较强 ROS 的时刻,接合转移已经完成。接下来通过进一步实验证明,在产生大量 ROS 的 Rosup 作用下,接合转移并未发生显著提升(图 6(c))。故得出结论双酚 A 促进粪肠球菌中的耐药基因接合转移不是通过影响细菌产生氧化应激这一途径实现的。

本研究主要从双酚 A 对信息素编码基因的 mRNA 表达和信息素的生成等方面初步探讨了双酚 A 影响 pCF10 介导的耐药基因接合转移的机制。粪肠球菌 OG1RF 中 *ccfA* 基因编码一种名为 CcfA 的脂蛋白前体,成熟的多肽信息素是由 CcfA 经蛋白水解加工而成的<sup>[8]</sup>。为了防止信息素造成的自体诱导,供体细菌分泌抑制肽 iCF10 作为 cCF10 的竞争性抑制剂。抑制肽 iCF10 由 pCF10 质粒上的 *prgQ* 基因编码。双酚 A 可以促进编码信息素 cCF10 的 *ccfA* 基因的表达(图 7(a)),同时诱发了接合体系中的 *prgQ* 基因高表达。通过测定双酚 A 处理后接合体系上清液中信息素浓度显著升高(图 8),进一步证明双酚 A 可以通过促进信息素编码基因 *ccfA* 表达,继而促进信息素的生成,最终促进接合转移的高频发生。

综上所述,本研究初步证实了自然水体环境浓度下的双酚 A 能够促进信息素调控质粒 pCF10 介导的耐药基因接合转移,并对双酚 A 影响 pCF10 质粒接合转移的机制进行了初步探讨。目前关于双酚 A 成为内分泌干扰物的研究已有一些进展,但多局限于临床领域。而双酚 A 作为环境雌激素类污染物在环境中的行为和影响抗生素抗性基因扩散的机制尚缺乏系统研究。本研究证明双酚 A 除对人类健康造成直接影响外,还会影响环境中耐药基因的丰度,使抗生素抗性基因扩散形势更为严峻。本研

究将增强社会对环境雌激素污染物生物效应的认识和理解,填补双酚 A 这一传统环境污染物在生态安全领域的研究空缺。为人类与生态环境和谐共处提供理论基础,或将为实现对双酚 A 和抗生素抗性基因传播元件的监测和控制这一最终目标提供技术支持。本研究对双酚 A 影响耐药基因扩散的机制进行了初步的探索,但对于它的深层机制仍亟需进一步研究。信息素调控质粒介导的接合转移过程需要通过一个相对复杂的系统进行调控,如供、受体细菌间的粘附、质粒的切割、组装及跨膜转运等过程。双酚 A 是否对这些调控过程产生影响从而对质粒的接合转移造成影响,还有待于我们进一步研究。

**通讯作者简介:** 邱志刚(1979—),男,博士,研究员,主要研究方向细菌耐药性的产生、发展与控制。

#### 参考文献(References):

- [1] World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance [R]. Geneva: WHO, 2014
- [2] Wallace M J, Fishbein S R S, Dantas G. Antimicrobial resistance in enteric bacteria: Current state and next-generation solutions [J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1799654
- [3] Smillie C, Garcillán-Barcia M P, Francia M V, et al. Mobility of plasmids [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74(3): 434-452
- [4] Hirt H, Schlievert P M, Dunny G M. *In vivo* induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF<sub>10</sub> [J]. Infection and Immunity, 2002, 70(2): 716-723
- [5] Sterling A J, Snelling W J, Naughton P J, et al. Competent but complex communication: The phenomena of pheromone-responsive plasmids [J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(4): e1008310
- [6] Waters C M, Bassler B L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 319-346
- [7] Wardal E, Sadowy E, Hryniewicz W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids [J]. Polish Journal of Microbiology, 2010, 59(2): 79-87
- [8] Antiporta M H, Dunny G M. ccfA, the genetic determinant for the cCF10 peptide pheromone in *Enterococcus faecalis* OG1RF [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 1155-1162
- [9] Varahan S, Harms N, Gilmore M S, et al. An ABC transporter is required for secretion of peptide sex pheromones in *Enterococcus faecalis* [J]. mBio, 2014, 5(5): e01726-e01714
- [10] Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics [J]. Infection Ecology & Epidemiology, 2015, 5(1): 28564
- [11] Berendonk T U, Manaia C M, Merlin C, et al. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(5): 310-317
- [12] Qiu Z G, Yu Y M, Chen Z L, et al. Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(13): 4944-4949
- [13] Zhang Y, Gu A Z, He M, et al. Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across genera [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(1): 570-580
- [14] Pu Q, Fan X T, Li H, et al. Cadmium enhances conjugative plasmid transfer to a fresh water microbial community [J]. Environmental Pollution, 2021, 268(Pt B): 115903
- [15] Kundakovic M, Champagne F A. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2011, 25(6): 1084-1093
- [16] Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011, 214(5): 339-347
- [17] Chapin R E, Adams J, Boekelheide K, et al. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A [J]. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2008, 83(3): 157-395
- [18] Clayton E M, Todd M, Dowd J B, et al. The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the US population, NHANES 2003-2006 [J]. Environmental Health Perspectives, 2011, 119(3): 390-396
- [19] Richter C A, Birnbaum L S, Farabollini F, et al. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies [J]. Reproductive Toxicology, 2007, 24(2): 199-224
- [20] Sheng Z G, Zhu B Z. Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-A [J]. Environmental Health Perspectives, 2011, 119(12): 1775-1780
- [21] Huang Y Q, Wong C K, Zheng J S, et al. Bisphenol A

- (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts [J]. *Environment International*, 2012, 42: 91-99
- [22] Catenza C J, Farooq A, Shubear N S, et al. A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues [J]. *Chemosphere*, 2021, 268: 129273
- [23] Yamazaki E, Yamashita N, Taniyasu S, et al. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 122: 565-572
- [24] Prossnitz E R, Barton M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 389(1-2): 71-83
- [25] Christie P J, Dunny G M. Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions [J]. *Plasmid*, 1986, 15(3): 230-241
- [26] Nakayama J, Ruhfel R E, Dunny G M, et al. The prgQ gene of the *Enterococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid pCF10 encodes a peptide inhibitor, iCF<sub>10</sub> [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(23): 7405-7408
- [27] Flanagan S E, Zitzow L A, Su Y A, et al. Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis* [J]. *Plasmid*, 1994, 32(3): 350-354
- [28] Suzuki M T, Taylor L T, DeLong E F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4605-4614
- [29] Jiang Q, Feng M B, Ye C S, et al. Effects and relevant mechanisms of non-antibiotic factors on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in water environments: A review [J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 806(Pt 3): 150568
- [30] Dunny G M, Craig R A, Carron R L, et al. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: Production of multiple sex pheromones by recipients [J]. *Plasmid*, 1979, 2(3): 454-465
- [31] Zhang H F, Zhang Y P, Li J B, et al. Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 655: 607-613
- [32] Yan Z Y, Liu Y H, Yan K, et al. Bisphenol analogues in surface water and sediment from the shallow Chinese freshwater lakes: Occurrence, distribution, source apportionment, and ecological and human health risk [J]. *Chemosphere*, 2017, 184: 318-328
- [33] Moreman J, Lee O, Trznadel M, et al. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21): 12796-12805
- [34] 任文娟, 汪贞, 王蕾, 等. 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎及幼鱼的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(1): 184-192
- Ren W J, Wang Z, Wang L, et al. Effects of bisphenol A and its analogues on zebrafish embryos and larvae [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(1): 184-192 (in Chinese)
- [35] Fan H J, Fernando S R, Jiang L H, et al. Bisphenol A analogues suppress spheroid attachment on human endometrial epithelial cells through modulation of steroid hormone receptors signaling pathway [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2882
- [36] Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Gaudriault P, et al. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis [J]. *Human Reproduction*, 2017, 32(7): 1465-1473
- [37] Alipour M, Hajiesmaili R, Talebjannat M, et al. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 287458
- [38] Hirt H, Greenwood-Quaintance K E, Karau M J, et al. *Enterococcus faecalis* sex pheromone cCF10 enhances conjugative plasmid transfer *in vivo* [J]. *mBio*, 2018, 9(1): e00037-e00018
- [39] Bouskine A, Nebout M, Brückner-Davis F, et al. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(7): 1053-1058
- [40] Catron T R, Keely S P, Brinkman N E, et al. Host developmental toxicity of BPA and BPA alternatives is inversely related to microbiota disruption in zebrafish [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2019, 167(2): 468-483
- [41] Jasni A S, Mullany P, Hussain H, et al. Demonstration of conjugative transposon (Tn5397)-mediated horizontal gene transfer between *Clostridium difficile* and *Enterococcus faecalis* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(11): 4924-4926
- [42] Weigel L M, Clewell D B, Gill S R, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus* [J]. *Science*, 2003, 302(5650): 1569-1571
- [43] Christie P J, Korman R Z, Zahler S A, et al. Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis*

- plasmid pCF10: Identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(6): 2529-2536
- [44] Prüss A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water [J]. *International Journal of Epidemiology*, 1998, 27(1): 1-9
- [45] Kang J H, Asai D, Katayama Y. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2007, 37(7): 607-625
- [46] Kleerebezem M, Quadri L E N, Kuipers O P, et al. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria [J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(5): 895-904
- [47] Nasser W, Reverchon S. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387(2): 381-390
- [48] 马丽娜, 米宏霏, 薛云新, 等. ROS 在细菌耐药及抗生素杀菌中的作用机制[J]. *遗传*, 2016, 38(10): 902-909  
Ma L N, Mi H F, Xue Y X, et al. The mechanism of ROS regulation of antibiotic resistance and antimicrobial lethality [J]. *Hereditas*, 2016, 38(10): 902-909 (in Chinese)
- [49] 刘武康, 吴淑燕, 陈国薇, 等. 细菌产生的活性氧及其功能[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(1): 89-95  
Liu W K, Wu S Y, Chen G W, et al. The reactive oxygen species generated by bacteria and its functions [J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(1): 89-95 (in Chinese)
- [50] Boles B R, Singh P K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (34): 12503-12508
- [51] Aiassa V, Barnes A I, Albesa I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 393(1): 84-88
- [52] van Acker H, Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria [J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(6): 456-466
- [53] Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species [J]. *International Microbiology*, 2000, 3(1): 3-8
- [54] Yu Z G, Wang Y, Lu J, et al. Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15 (7): 2117-2130
- [55] Jia Y Q, Wang Z Q, Fang D, et al. Acetaminophen promotes horizontal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance genes [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 782: 146916
- [56] Huang M Q, Liu S, Fu L, et al. Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells [J]. *Chemosphere*, 2020, 253: 126707
- ◆