

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211108002

周宏瑞, 杨雨桐, 杨晓波, 等. 纳米二硫化钼促进粪肠球菌中信息素诱导质粒介导的耐药基因接合转移[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(1): 160-169
Zhou H R, Yang Y T, Yang X B, et al. Molybdenum disulfide promotes pheromone-induced plasmid mediated conjugation transfer of drug resistance genes in *Enterococcus faecalis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(1): 160-169 (in Chinese)

纳米二硫化钼促进粪肠球菌中信息素诱导质粒介导的耐药基因接合转移

周宏瑞, 杨雨桐, 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: 2021-11-08 录用日期: 2021-12-30

摘要: 粪肠球菌是一种通常寄居在人和动物胃肠道中的机会致病菌, 并广泛存在于环境中。其可通过基因的水平转移获得抗生素抗性。纳米二硫化钼(molybdenum disulfide, MoS₂)是一种新型的二维层状材料, 有广泛的应用前景, 但缺乏对纳米 MoS₂ 完整的生物安全评价。本研究以粪肠球菌为接合模型, 将纳米 MoS₂ 加入接合体系中研究其对信息素诱导质粒 pCF10 接合转移的影响。研究发现, 纳米 MoS₂ 具有促进接合转移的作用, 其中 25 mg·L⁻¹ 的纳米 MoS₂ 促进效果最明显, 可以将接合频率提高 5 倍~8 倍。因为纳米 MoS₂ 良好的生物相容性对细胞膜通透性、细胞内活性氧水平和接合转移调控基因的表达都没有产生明显影响。纳米 MoS₂ 具有吸附性能, 而且又是片层状的结构, 这使得其可以附着在细菌表面, 促进细菌的聚集, 进而促进 pCF10 质粒接合转移的发生。

关键词: 纳米二硫化钼; 粪肠球菌; 耐药基因; 接合转移

文章编号: 1673-5897(2022)1-160-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Molybdenum Disulfide Promotes Pheromone-induced Plasmid Mediated Conjugation Transfer of Drug Resistance Genes in *Enterococcus faecalis*

Zhou Hongrui, Yang Yutong, 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, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China

Received 8 November 2021 accepted 30 December 2021

Abstract: *Enterococcus faecalis* is an opportunistic pathogen that usually resides in the gastrointestinal tract of humans and animals and widely exists in the environment. It can acquire antibiotic resistance through horizontal gene transfer and facilitate the spread of antibiotics resistance genes (ARGs). The problem of bacterial resistance is becoming increasingly serious, resulting in increased economic losses and deaths. Molybdenum disulfide (MoS₂) is a new kind of two-dimensional layered material, which has a wide application prospect, but the complete biosafety evaluation of MoS₂ is still lacking. In this study, *Enterococcus faecalis* was used as the conjugation model bacteri-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42177414, 31470234)

第一作者: 周宏瑞(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为纳米材料生物效应, E-mail: 13427569748@163.com

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

um, and nano-MoS₂ was added into the conjugation system to study its effect on the conjugation transfer of the plasmid pCF10. It was found that nano-MoS₂ can promote conjugation transfer, and 25 mg·L⁻¹ nano-MoS₂ has the most obvious effect, which can increase the conjugation frequency by 5 ~ 8 times. Because of the good biocompatibility of nano-MoS₂, it has no significant impact on cell membrane permeability, intracellular reactive oxygen species level and the expression of conjugation and transfer regulation genes. Nano-MoS₂ can attach to the surface of bacteria to aggregate bacteria, and then promote the conjugation transfer of pCF10 plasmid due to its adsorption properties and lamellar structure. Adhesion of bacteria is an important prerequisite for the occurrence of conjugation transfer, which may be the reason why nano-MoS₂ promotes conjugation transfer.

Keywords: molybdenum disulfide; *Enterococcus faecalis*; antibiotic resistance gene; conjugation transfer

细菌耐药已经成为人类健康的一大威胁,具有抗生素抗性的细菌引起的感染每年导致全球约 70 万人死亡,估计到 2050 年,每年有超过 1 000 万人死亡^[1]。耐药问题之所以发展得如此迅速,主要原因之一是抗生素抗性基因(antibiotics resistance genes, ARGs)可以通过水平转移的方式进行传播。水平转移可以发生在任何环境中,特别是当细菌密度较高时,例如,在土壤、污水处理厂以及人和动物的肠道微生物群中^[2-7]。水平转移方式包括转化、转导和接合转移^[8],其中接合转移是水平转移的主要方式^[9]。

自 20 世纪 80 年代以来,由于粪肠球菌的耐药性不断增强,粪肠球菌菌株越来越多地与医院获得性感染有关^[10-12]。粪肠球菌在环境中分布也十分广泛,养殖场废水、生活污水、自然水源、土壤、饲料和粪便中都有分布^[13],其对多种抗菌药物具有耐药性,也容易被诱导产生获得性耐药^[14]。粪肠球菌间的 ARGs 主要通过信息素诱导的接合质粒进行转移传播,典型的信息素响应质粒有 pCF10、pAD1、pAM373 和 pMG2200,其中 pCF10 质粒是最有代表性的一种^[15]。其转移机制是由受体菌分泌一种 cCF10 信息素,供体菌识别到信息素后开始启动质粒的接合转移过程^[16]。pCF10 质粒的转移频率可以达到 10⁻² ~ 10^{-1[17]},主要发生在可引起严重院内感染的肠球菌间,能够使肠球菌获得对被称为最后一种抗生素的万古霉素的耐药性^[15]。粪肠球菌耐药性的传播不仅给临床中细菌感染的治疗带来巨大挑战,也严重影响到生态安全。经过抗生素治疗的动物的污水和粪便污染水源,可导致 ARGs 传播,可以传播到水产生物,并通过食物链逐级传递,最终影响整个生态环境^[18]。

水环境是 ARGs 的巨大储存库^[19],在水环境中还会有一些纳米材料^[20]。已有研究表明纳米材料可

以促进 ARGs 的传播^[21]。一些新兴纳米材料的生物效应和生态安全性有待深入研究。纳米二硫化钼(molybdenum disulfide, MoS₂)是一种新兴的过渡金属二硫化物,由 1 层钼和 2 层硫组成,是类似石墨烯的二维材料。因其具有高的比表面积、优异的光热转换性能、易于功能化等优点,已在催化、传感、载药和疾病治疗等领域得到广泛应用^[22]。随着纳米 MoS₂ 应用的增多,其在环境中的残留水平可能增加,与其他纳米粒子一样,纳米 MoS₂ 的积累对生态环境和人类健康构成了威胁。本文研究了纳米 MoS₂ 对粪肠球菌中信息素诱导的耐药质粒接合转移的影响,并初步研究了其机制。为研究纳米 MoS₂ 的生物效应及其安全应用提供理论指导。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 菌株、质粒及培养条件

本实验中用到的粪肠球菌 OG1RF^[23] (ATCC 47077, NCBI:txid474186)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),信息素诱导质粒 pCF10 由美国明尼苏达大学 Gary Dunny 教授惠赠。受体菌为粪肠球菌 OG1RS,由粪肠球菌 OG1RF 经本实验室诱导获得链霉素抗性,并命名为 OG1RS;供体菌为粪肠球菌 OG1RF(pCF10),其携带信息素调控质粒 pCF10^[24],该质粒编码四环素抗性基因。供体菌、受体菌均利用 BHI 液体培养基培养,并添加相应的抗生素(受体菌:3 000 μg·mL⁻¹链霉素(S8290, Solarbio),供体菌:10 μg·mL⁻¹四环素(A500731, Sangon Biotech))。菌液在 37 °C 恒温恒湿培养箱中培养 10 h 后,将菌液按 1:10 的比例转接至新鲜的 BHI 培养基中,置于 37 °C 恒温恒湿培养箱中 4 ~ 5 h 生长至对数期后备用。

1.2 接合转移实验

菌液在 4 °C 条件下 6 000 r·min⁻¹ 转速离心

5 min (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, 德国), 弃上清后用含 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)重悬菌液并洗涤3次, 最后用 LB 液体培养基重悬菌液并调整菌液浓度至 $1.5 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。供、受体菌按 1:1 的比例混合后加入纳米 MoS_2 悬液(NM000310, Solarbio), 使其终浓度为 1、5、10、25、50、100 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并用振荡器振荡混匀, 每组 3 个重复。将接合菌液放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿培养箱培养。2 h 后取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 菌液利用含 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 溶液梯度稀释, 取合适稀释梯度的 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 菌液分别滴在含有 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素和 $3000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的双抗 BHI 琼脂培养基上筛选接合子, 含有 $3000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素 BHI 琼脂培养基上筛选受体菌、含有 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素的 BHI 琼脂培养基上筛选供体菌, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 36 h 左右计数形成的单菌落, 并计算接合频率(接合频率=接合子数量/受体菌数量)。

1.3 不同因素对接合转移的影响

分别研究不同时间、不同温度和不同 pH 条件下的接合转移规律。将纳米 MoS_2 加入接合体系中, 使终浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在培养箱放置不同时刻然后对接合子计数, 计算接合频率; 将接合体系在不同温度下(16、26、30 和 $37 \text{ }^\circ\text{C}$)接合 2 h, 计算接合频率; 用 NaOH 溶液和 HCl 溶液调节接合体系的初始 pH, 使 pH 分别为 6、7 和 8, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下接合 2 h, 计算接合频率。

1.4 纳米 MoS_2 作用后活性氧水平检测

对数生长期的菌液用 PBS 洗涤 2 次, 再用液体 LB 培养基重悬, 并稀释至 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。装载 DCFH-DA 探针(CA1410, Solarbio)终浓度为 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 20 min 后用 PBS 洗掉多余探针, 加入纳米 MoS_2 使终浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 作用 2 h, 用酶标仪(Molecular Devices, SpectraMax M5, 美国)检测荧光强度(激发光 488 nm, 发射光 525 nm)。

1.5 纳米 MoS_2 作用后细胞膜通透性检测

对数生长期的菌液用 PBS 洗涤 2 次, 再用液体 LB 培养基重悬, 并稀释至 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。供、受体菌按 1:1 的比例混合后加入纳米 MoS_2 悬液, 使终浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (空白对照组加入等量双蒸水), 作用 2 h 后, 稀释至 $10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 1 mL 加入 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 的 PI 染液(E607306, Sangon Biotech), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱避光放置 20 min, 用流式细胞仪(Cell Sorter S3e,

BioRad, 美国)检测。

1.6 实时定量聚合酶链反应定量基因表达

实验组和对照组接合 2 h 后收集菌体用 RNA 提取试剂盒(DP430, 天根)提取总 RNA, 再用反转录试剂盒(KR116-02, 天根)将 RNA 反转录得到 cDNA。以 cDNA 作为模板, 用 PowerUp SYBR Master Mix(A25742, Thermo)在 CFX96 BioRad qPCR 系统(CFX96 Optics Module, BioRad, 新加坡)上进行实时定量聚合酶链反应(qPCR), 定量基因的表达。qPCR 反应体系如下: $10 \text{ } \mu\text{L}$ PowerUp SYBR Master Mix, $7 \text{ } \mu\text{L}$ ddH₂O, 上下游引物各 $1 \text{ } \mu\text{L}$, 模板 $1 \text{ } \mu\text{L}$; qPCR 反应条件如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 40 个循环的 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 终止 10 min, 熔解曲线 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 升至 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 。qPCR 中所有引物使用 DNASTar 7.1 设计, 由上海生物工程合成, 序列如表 1 所示。

实验中基因的表达量由绝对定量的方法计算获得, 并利用 *16S* RNA 作为内参基因修正体系中的细胞含量。相关基因的标准曲线如图 1 所示。

1.7 扫描电镜观察细菌形态

实验组和对照组接合 2 h 后在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清后加入 2.5% 戊二醛(PH9003, Phygene)在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下固定 48 h, PBS 离心洗涤 3 次, 依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 无水乙醇梯度脱水, 其中 100% 无水乙醇脱水 2 次。每次脱水 10 min, 然后 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 最后置于冷冻干燥机(FDU-1200, EYELA, 上海, 中国)中冻干, 用扫描电镜(Sigma300, ZEISS, 德国)观察并用能谱仪(Xplore 30, OXFORD, 英国)进行元素扫描分析。

2 结果(Results)

2.1 纳米 MoS_2 浓度对 pCF10 质粒接合转移的影响

接合 2 h 后, 空白对照组的接合频率为 3.7×10^{-3} , 与空白对照组比较, 经过纳米 MoS_2 处理后接合频率都有所提高, 最高可以达到 2.4×10^{-2} 。纳米 MoS_2 的作用具有浓度效应, 促进效果呈现先增大再减小的趋势, 其中 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米 MoS_2 的促进效果最明显, 接合频率可以达到空白对照组的 5 倍~8 倍(图 2(a))。但对供、受体菌的生长无影响(图 2(b)), 说明纳米 MoS_2 只影响了接合转移过程。

2.2 纳米 MoS_2 作用时间对 pCF10 质粒接合转移的影响

将纳米 MoS_2 加入接合体系中, 使终浓度为 25

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对不同时刻的接合子计数,计算接合频率。空白对照组在 4 h 到达接合终点,接合频率最高,达到 1.4×10^{-2} 。纳米 MoS_2 作用后与对照组比较,1 ~ 8 h 的接合频率都有所提高,最高可以达到 3.7×10^{-2} ,并且将接合终点由 4 h 提前到 2 h。综合来看纳米 MoS_2 在不同时刻的促进效果不同,其中 2 h 时促进效果最明显,可以将接合频率提高 6 倍(图 3)。

2.3 纳米 MoS_2 作用下温度对 pCF10 质粒接合转移的影响

将接合体系在不同温度下接合 2 h,计算接合频率。对照组在 16 °C 的接合频率较低为 7×10^{-6} ,26 °C 接合频率提高到 1.3×10^{-3} ,26 ~ 37 °C 温度升高后接合频率基本不变。纳米 MoS_2 作用后随着温度升高接合频率增加,37 °C 接合频率最高,达到 4×10^{-3} 。实验组与对照组比较,37 °C 时促进效果最显(图 4)。

2.4 纳米 MoS_2 作用下 pH 对 pCF10 质粒接合转移的影响

调节接合体系的 pH,在 37 °C 条件下接合 2 h, pH=6 ~ 8 范围内,随着 pH 的升高,实验组与对照组的接合频率都增加,分别为 2.3×10^{-3} 和 3.7×10^{-3} 。pH 为 8.0 时促进效果最明显(图 5)。

2.5 纳米 MoS_2 对细胞膜通透性的影响

质粒的接合转移需要供体菌和受体菌细胞膜间的接触融合,这一过程与细胞膜状态直接相关。为了确定纳米 MoS_2 影响接合转移的机制,对纳米

MoS_2 处理后的细胞膜通透性进行了测定。PI 染液是一种细胞核染色试剂,不能通过完整的细胞膜,但可以通过破损的细胞膜对核染色。通过检测对照组与实验组的荧光细胞的比例,可以反映细胞膜通透性的变化。经检测,空白对照组中荧光细胞比例为 0.55%; MoS_2 作用 2 h 后荧光细胞比例为 0.66%(图 6)。荧光细胞比例只发生微小变化,二者没有统计学差异,说明纳米 MoS_2 没有对细胞膜通透性产生明显影响。

2.6 纳米 MoS_2 对细胞活性氧水平的影响

纳米材料的小粒径及高生物活性,可以使细菌产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$),进而产生活性氧(ROS)反应,利用 DCFH-DA 探针可以检测细胞内活性氧水平。DCFH-DA 探针进入细胞后,在活性氧存在的条件下,被氧化生成荧光物质,通过检测对照组与实验组的荧光强度,可以反映细胞内活性氧水平。经检测, MoS_2 作用 2 h 后,供体菌和受体菌中荧光强度值都在 800 左右(图 7),说明纳米 MoS_2 没有对细胞活性氧水平产生明显影响。

2.7 纳米 MoS_2 对 pCF10 质粒接合转移调控基因表达的影响

纳米 MoS_2 可以促进 pCF10 质粒接合转移的发生,浓度为 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纳米 MoS_2 ,在 37 °C、pH=8.0 的条件下作用于接合体系 2 h 后 pCF10 质粒的接合转移频率可升高 5 倍 ~ 8 倍。因为接合转移过程受

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence	功能 Function	产物长度/bp Products size/bp
<i>prgA</i>	<i>prgA</i> -F	GTTTGATGATGGCCGCTTAGGTTA	编码黏附蛋白	175
	<i>prgA</i> -R	CACTTCGCCGTTTTGGTATTGACT	Coding adhesive protein	
<i>prgB</i>	<i>prgB</i> -F	AGCGGATGGAAAATTTACTCACC	编码黏附蛋白	197
	<i>prgB</i> -R	GCGCACTAGATACAGGCACATTA	Coding adhesive protein	
<i>prgY</i>	<i>prgY</i> -F	TTTGGAAGGTGCGGAAGAATC	调控供体自诱导	202
	<i>prgY</i> -R	GTAATGCGCCTGCCAATA	Regulating self-induction	
<i>prgZ</i>	<i>prgZ</i> -F	GACTTTGACTGCAGGGACACC	负责信息素转运	202
	<i>prgZ</i> -R	AGGCCATCTCTAATCACAAT	Transporting pheromone	
<i>prgQ</i>	<i>prgQ</i> -F	TATAGGAGGGGTGTAATGAAAAC	编码 iCF10 信息素	143
	<i>prgQ</i> -R	CCGTCTATGGCAGTCG	Coding iCF10 pheromone	
<i>ccfA</i>	<i>ccfA</i> -F	AGATATACGAAGGCCCGCTGAA	编码 cCF10 信息素	243
	<i>ccfA</i> -R	AATTAGTTATCCGCTGCTCCTGA	Coding cCF10 pheromone	
<i>16S</i>	<i>16S</i> -F	GCGCGGTGCCTAATACA	内参基因	219
	<i>16S</i> -R	CCGCGGGTCCATCC	Reference genes	

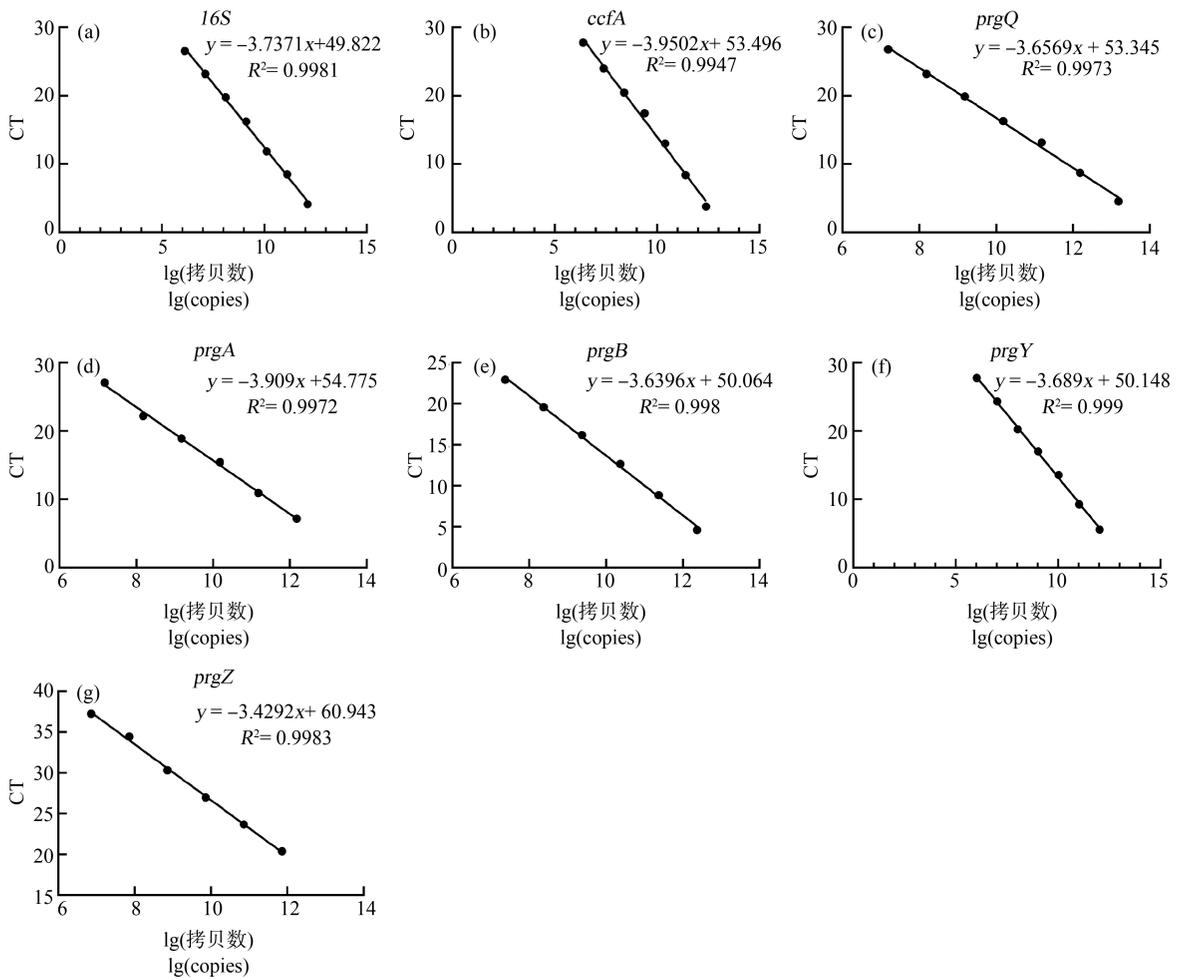


图 1 qPCR 实验中基因的标准曲线

注: CT 值表示扩增程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时所对应的扩增循环数(cycle threshold)。

Fig. 1 Standard curves of genes in qPCR experiments

Note: CT represents the corresponding amplification cycle threshold when the fluorescence signal of the amplification product reaches the set fluorescence threshold during the amplification process.

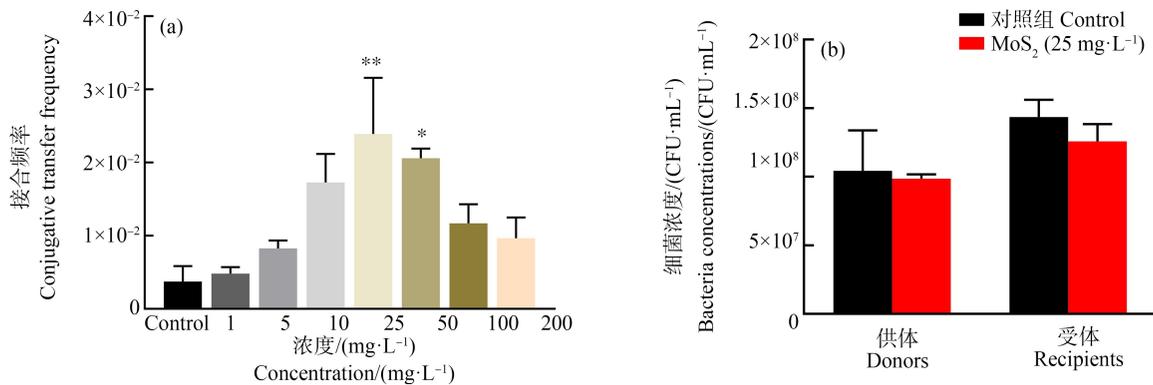


图 2 纳米 MoS₂ 对接合转移的影响

注: (a) 不同浓度纳米 MoS₂ 对 pCF10 质粒接合转移的影响规律; (b) 纳米 MoS₂ 对供体菌和受体菌的影响; MoS₂ 表示二硫化钼, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect of nano-MoS₂ on conjugation transfer

Note: (a) Effects of different concentrations of nano-MoS₂ on pCF10 plasmid conjugation and transfer; (b) Effects of nano-MoS₂ on donor bacteria and recipient bacteria; MoS₂ stands for molybdenum disulfide, * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$.

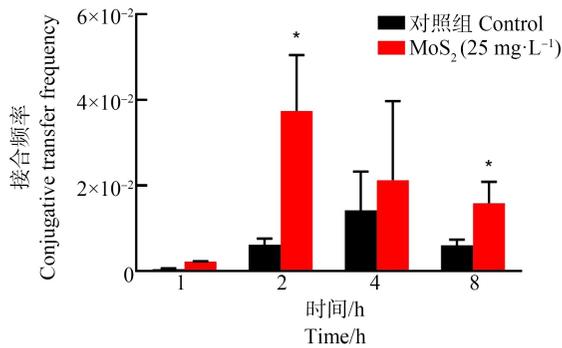


图 3 纳米 MoS₂ 作用时间对 pCF10 质粒接合转移的影响

注: *表示 P<0.05。

Fig. 3 Effect of MoS₂ action time on pCF10 plasmid

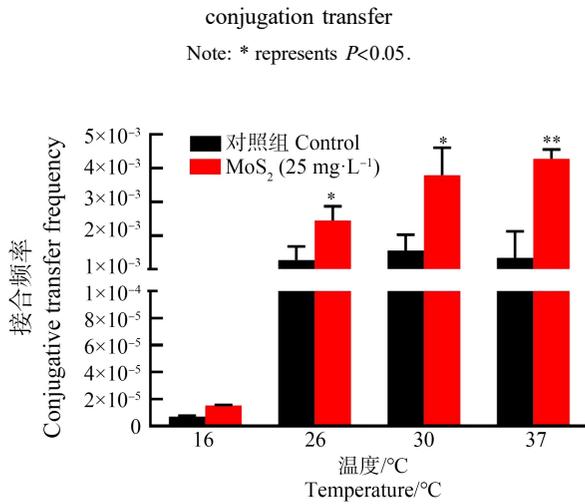


图 4 纳米 MoS₂ 作用下温度对 pCF10 质粒接合转移的影响

注: *表示 P<0.05, **表示 P<0.01。

Fig. 4 Effect of temperature on pCF10 plasmids conjugation transfer under nano-MoS₂

Note: * represents P<0.05, ** represents P<0.01.

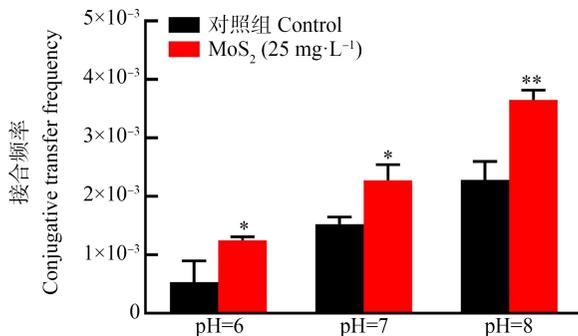


图 5 纳米 MoS₂ 作用下 pH 对 pCF10 质粒接合转移的影响

注: *表示 P<0.05, **表示 P<0.01。

Fig. 5 Effect of pH on pCF10 plasmids conjugation transfer under nano-MoS₂

Note: * represents P<0.05, ** represents P<0.01.

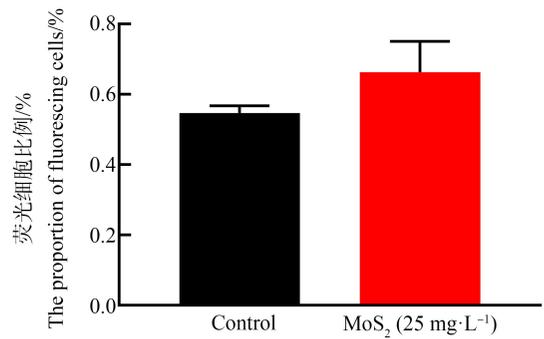


图 6 纳米 MoS₂ 对细胞膜通透性的影响

Fig. 6 Effect of nano-MoS₂ on cell membrane permeability

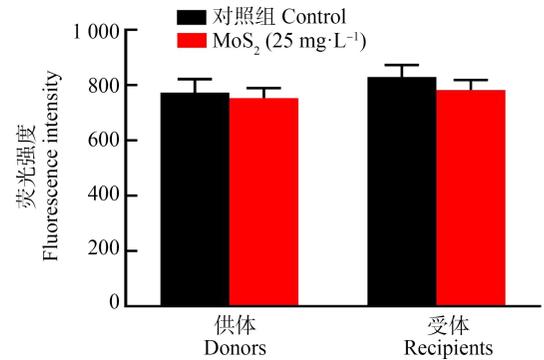


图 7 纳米 MoS₂ 对细胞活性氧水平的影响

Fig. 7 Effect of nano-MoS₂ on the level of reactive oxygen species in cells

到一系列基因的调控,用荧光定量 PCR 的方法对调控基因的表达情况进行定量。*ccfA* 和 *prgQ* 分别是编码信息素 cCF10 和 iCF10 的基因, *prgA* 和 *prgB* 是编码黏附蛋白的基因, *prgZ* 是负责信息素导入的基因, *prgY* 是供体自诱导的调控基因。25 mg·L⁻¹ 的纳米 MoS₂ 作用于接合体系 2 h 后,与空白对照组比较,这些基因的表达都无明显变化(图 8),说明纳米 MoS₂ 不会影响基因的表达,这是因为纳米 MoS₂ 是惰性材料,有良好的生物相容性。

2.8 纳米 MoS₂ 促进细菌聚集

细菌聚集是接合转移发生的重要前提,粪肠球菌自身的黏附蛋白可以促进细菌的黏附和聚集,但纳米 MoS₂ 作用后并没有使黏附蛋白编码基因上调。通过扫描电镜发现,纳米 MoS₂ 加入到接合体系中会附着在细菌表面(图 9),能谱仪元素分析的结果也显示在团聚的细菌表面有钼(molybdenum, Mo)元素和硫(sulfur, S)元素分布(图 10)。因为纳米 MoS₂ 本身具有吸附性能,而且 MoS₂ 是片层状的结构,不容易进入细胞内部,这使得纳米 MoS₂ 会吸附

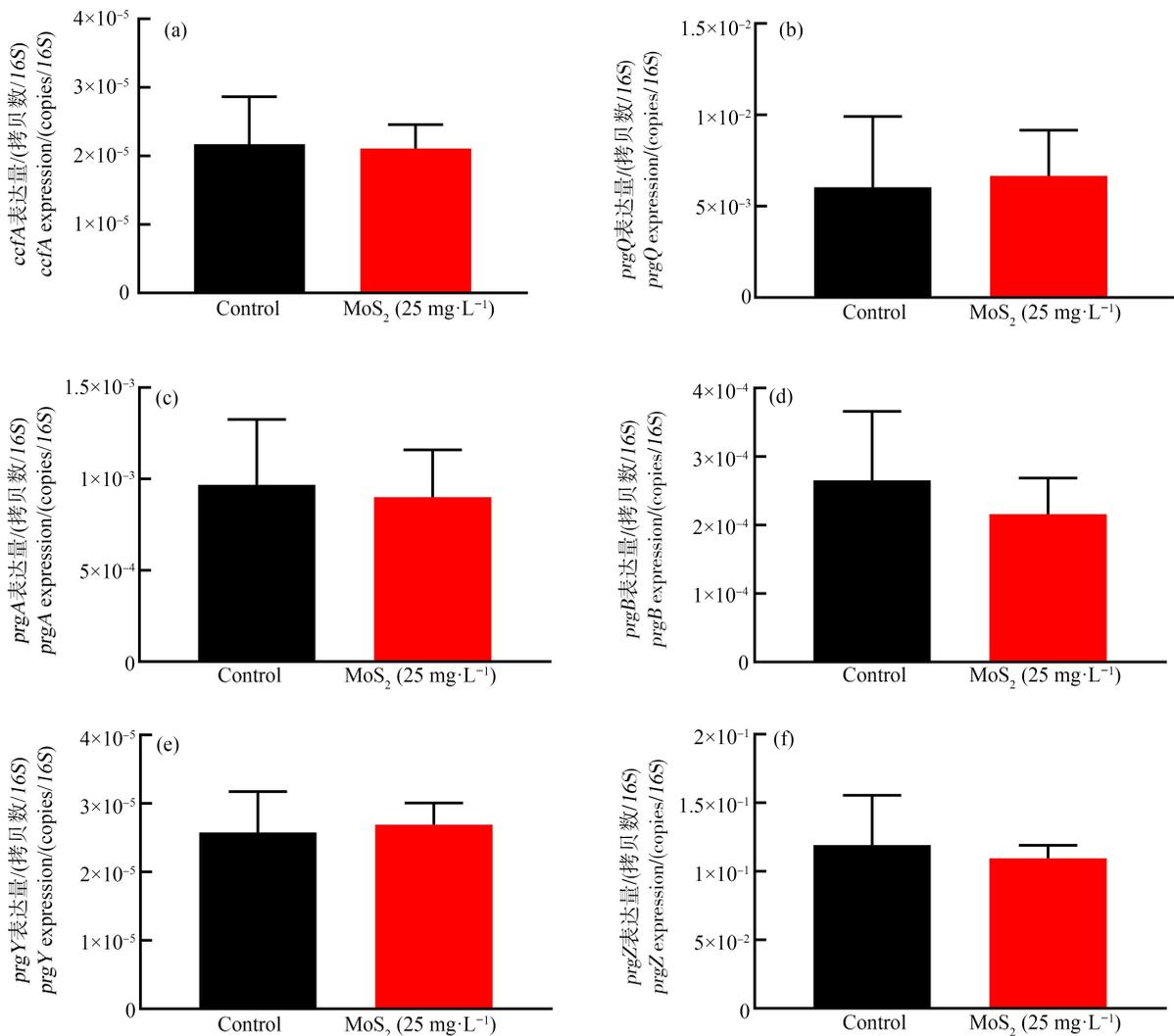


图8 纳米 MoS₂ 对质粒接合转移调控基因表达的影响

注:(a) 纳米 MoS₂ 对编码 cCF10 信息素的 *ccfA* 基因的影响;
 (b) 纳米 MoS₂ 对编码 iCF10 信息素的 *prgQ* 基因的影响;(c) 纳米 MoS₂ 对编码黏附蛋白的 *prgA* 基因的影响;
 (d) 纳米 MoS₂ 对编码黏附蛋白的 *prgB* 基因的影响;(e) 纳米 MoS₂ 对供体自诱导调控基因 *prgY* 的影响;(f) 纳米 MoS₂ 对负责信息素导入的 *prgZ* 基因的影响。

Fig. 8 Effect of nano-MoS₂ on gene expression of plasmid conjugation transfer

Note: (a) Effect of nano-MoS₂ on *ccfA* gene encoding cCF10 pheromone;
 (b) Effect of nano-MoS₂ on *prgQ* gene encoding iCF10 pheromone; (c) Effect of nano-MoS₂ on *prgA* gene encoding adhesive protein; (d) Effect of nano-MoS₂ on *prgB* gene encoding adhesive protein; (e) Effect of nano-MoS₂ on donor self-induced regulatory gene *prgY*; (f) Effect of nano-MoS₂ on *prgZ* gene responsible for pheromone import.

在细菌表面。与空白对照组比较,表面吸附了纳米 MoS₂ 的细菌会变得更加聚集(图 9),进而促进了接合转移的发生,使接合频率提高。

3 讨论 (Discussion)

粪肠球菌是一种通常生活在人类和其他动物胃肠道中的细菌,也会作为益生菌添加到饲料中^[25]。

由于粪便污染和饲料浪费,最终会导致环境中粪肠球菌的数量增加。同时革兰氏阳性菌中的肠球菌、链球菌和葡萄球菌是引起医院感染最常见的病原体,在公共卫生方面需要特别关注致病性革兰氏阳性菌中耐药性的传播。例如万古霉素的耐药性,这在肠球菌中很常见,虽然肠球菌感染一般不会危及生命,但万古霉素耐药基因一旦传播给金黄色葡萄

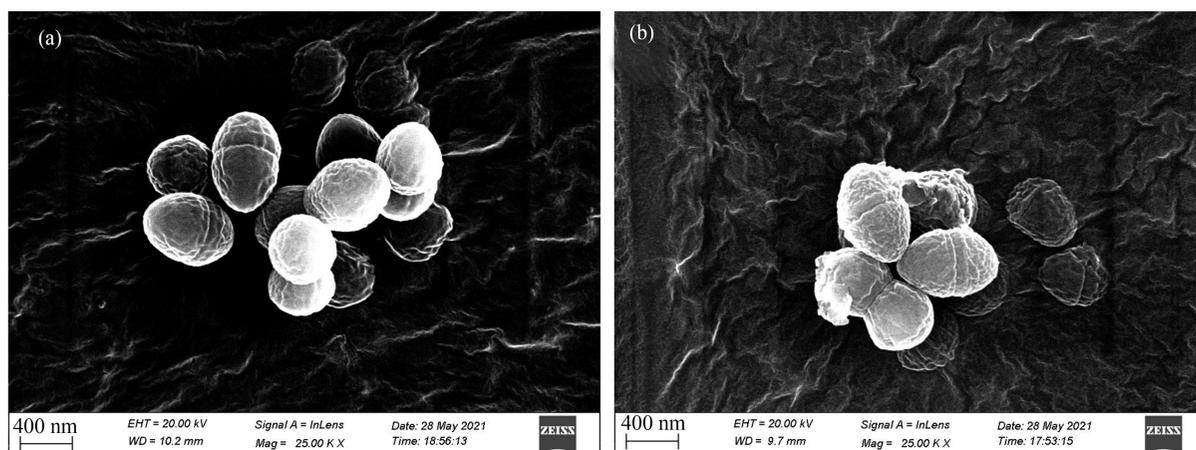


图 9 纳米 MoS_2 促进细菌聚集

注:(a) 空白对照组;(b) 加入纳米 MoS_2 的实验组。

Fig. 9 Bacterial aggregation promoted by nano- MoS_2

Note: (a) Blank control group; (b) Added nano- MoS_2 .

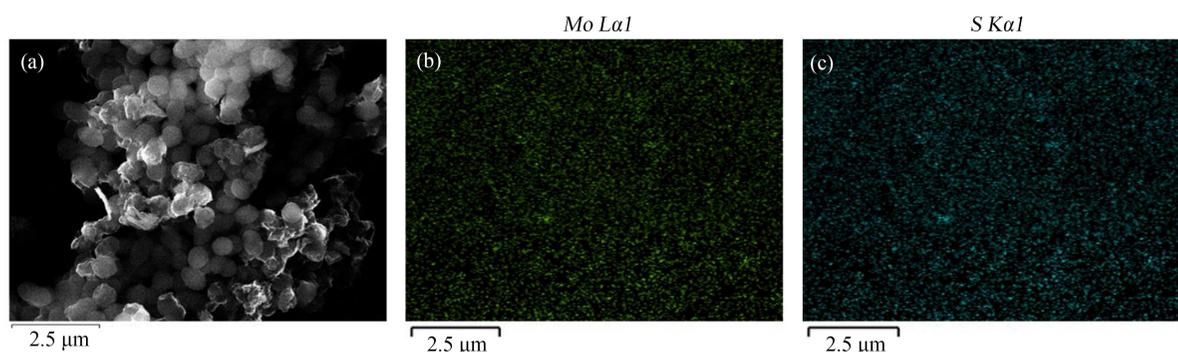


图 10 纳米 MoS_2 附着在细菌表面

注:(a) SEM 图像;(b) Mo 元素分布;(c) S 元素分布;Mo 表示钼元素,S 表示硫元素。

Fig. 10 Nano- MoS_2 attached to the surface of bacteria

Note: (a) SEM images; (b) Distribution of Mo element; (c) Distribution of S element; Mo stands for molybdenum element, and S stands for sulfur element.

球菌等细菌就会导致致命疾病^[26]。临床上肠球菌已成为引起医院感染的第二大致病菌^[27],并可以通过接合转移的方式传播 ARGs^[16],使其对人类健康和环境安全的风险日益增加。然而,目前人们往往关注于革兰氏阴性菌,如大肠杆菌中耐药基因的接合转移研究,而忽视了革兰氏阳性菌中耐药基因的接合转移。因此本研究中建立了革兰氏阳性粪肠球菌中 pCF10 质粒介导的耐药基因接合转移模型。

pCF10 质粒是信息素诱导质粒,接合转移过程受到信息素的调节^[16],对编码信息素的 *ccfA* 和 *prgQ* 基因,以及与信息素相关的 *prgY* 和 *prgZ* 基因的表达进行定量分析,发现纳米 MoS_2 并没有对这些基因的表达产生影响,说明纳米 MoS_2 没有影响

信息素的产生和转运。另外黏附蛋白在 pCF10 质粒的接合转移过程中也发挥重要作用,它使供体菌与受体菌可以紧密地结合在一起。对编码黏附蛋白的 *prgA* 和 *prgB* 基因的表达进行定量分析,发现纳米 MoS_2 同样没有对这些基因的表达产生影响。

一些纳米材料会通过影响活性氧系统和改变细胞膜的通透性影响质粒的接合转移。例如纳米氧化铝可以使革兰氏阴性菌中羟基自由基的生成增加,同时细菌的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性、超氧化物歧化酶活性和谷胱甘肽还原酶活性也随着纳米氧化铝水平的升高而升高。另外还会破坏细胞膜结构并进入细菌细胞^[21]。对本实验中纳米 MoS_2 作用后粪肠球菌的活性氧水平和细胞膜的通透性进行了测

定,发现纳米 MoS₂ 对活性氧系统和细胞膜的通透性均没有影响,这一结果与基因表达的结果一致。这可能是由于粪肠球菌是革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,纳米材料不易进入细菌细胞,另外纳米 MoS₂ 是片层状的二维结构,比纳米颗粒更难进入细胞;纳米 MoS₂ 还具有良好的生物相容性,这些性状使得纳米 MoS₂ 不会影响细菌生长和细菌结构,因此分子水平和细胞膜水平没有发生变化。

扫描电镜和能谱分析结果表明,纳米 MoS₂ 会黏附在细菌表面,促进细菌聚集,为细菌之间的接合转移提供良好的条件,最终导致接合转移频率增加。也有报道称在转化过程中细菌的黏附和运动会使细菌摄入外界 DNA^[28],接合过程也是受体菌获取受体菌之外的 DNA,而且接合过程需要供体菌与受体菌接触,然后通过IV型分泌系统将供体中的质粒传递给受体^[29],所以细菌的聚集为接合转移的发生提供了很好的环境。纳米 MoS₂ 正是因为促进了细菌聚集才导致接合转移频率增加。

作为一种类石墨烯材料,MoS₂ 的规模化生产和市场化发展迅速^[30]。可能会有大量的 MoS₂ 从实验室中排出,此外,清洁产品和润滑剂的应用会将数以吨计的纳米 MoS₂ 释放到环境中^[31],MoS₂ 在环境中的释放将对生物体和人类健康构成潜在风险^[32]。虽然纳米 MoS₂ 具有良好的生物相容性,但是较高的浓度会对生物体表现出显著的毒性。目前关于纳米 MoS₂ 的环境残留浓度还未见报道,有一些关于纳米 MoS₂ 生物毒性的研究发现:50 mg·L⁻¹ 的 MoS₂ 对 A549 细胞活力的抑制率为 25.6%^[33]; >25 mg·L⁻¹ 的 MoS₂ 纳米片通过干扰细胞表面受体和 mTOR 途径诱导 LC3-GFP U87 细胞自噬^[34];饲料中 150 mg·kg⁻¹ MoS₂ 可引起肠道炎症,扰乱小鼠肠道氨基酸代谢和肠道微生物群落^[31]。本研究通过研究纳米 MoS₂ 对粪肠球菌中接合转移的影响,进一步完善了纳米 MoS₂ 的生态环境风险评价,为纳米 MoS₂ 的应用提供了更丰富的理论指导。

通讯作者简介:邱志刚(1979—),男,博士,研究员,主要研究方向为纳米材料生物安全性及细菌耐药基因。

参考文献 (References):

- [1] Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger S D, et al. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives [J]. EMBO Reports, 2020, 21(12): e51034
- [2] Forsberg K J, Reyes A, Wang B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens [J]. Science, 2012, 337(6098): 1107-1111
- [3] Karkman A, Do T T, Walsh F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water [J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(3): 220-228
- [4] Che Y, Xia Y, Liu L, et al. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by nanopore metagenomic sequencing [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 44
- [5] Thanner S, Drissner D, Walsh F. Antimicrobial resistance in agriculture [J]. mBio, 2016, 7(2): e02227-e02215
- [6] San Millan A. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context [J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(12): 978-985
- [7] Huddleston J R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes [J]. Infection and Drug Resistance, 2014, 7: 167-176
- [8] Furuya E Y, Lowy F D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(1): 36-45
- [9] Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, et al. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 964
- [10] George R C, Uttley A H. Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s [J]. Epidemiology and Infection, 1989, 103(3): 403-413
- [11] Mundy L M, Sahn D F, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(4): 513-522
- [12] Sievert D M, Ricks P, Edwards J R, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2009—2010 [J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2013, 34(1): 1-14
- [13] 游选旺,唐毕华,黄健. 214 株肠球菌的耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(6): 627-628
- [14] Raza T, Ullah S R, Mehmood K, et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review [J]. Journal of the Pakistan Medical Association, 2018, 68(5): 768-772
- [15] Price V J, Huo W W, Sharifi A, et al. CRISPR-cas and restriction-modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in *Enterococcus faecalis* [J]. mSphere, 2016, 1(3): e00064-e00016
- [16] Breuer R J, Hirt H, Dunny G M. Mechanistic features of the enterococcal pCF10 sex pheromone response and the

- biology of *Enterococcus faecalis* in its natural habitat [J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(14): e00733-e00717
- [17] 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
- [18] Witte W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14(4): 321-325
- [19] 俞道进, 曾振灵, 陈杖榴. 四环素类抗生素残留对水生生态环境影响的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(5): 515-517
- [20] Mackevica A, Olsson M E, Hansen S F. The release of silver nanoparticles from commercial toothbrushes [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 322(Pt A): 270-275
- [21] 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
- [22] Wang X, Mansukhani N D, Guiney L M, et al. Differences in the toxicological potential of 2D versus aggregated molybdenum disulfide in the lung [J]. *Small*, 2015, 11(38): 5079-5087
- [23] Dunny G M, Brown B L, Clewell D B. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: Evidence for a bacterial sex pheromone [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, 75(7): 3479-3483
- [24] Dunny G, Funk C, Adsit J. Direct stimulation of the transfer of antibiotic resistance by sex pheromones in *Streptococcus faecalis* [J]. *Plasmid*, 1981, 6(3): 270-278
- [25] 刘静慧, 吴峰洋, 陈宝江, 等. 粪肠球菌的益生特性和毒副作用研究[C]. 中国新疆和田: 第九届(2019)中国兔业发展大会, 2019
- [26] Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(2): 277-301
- [27] Hidron A I, Edwards J R, Patel J, et al. NHSN annual update: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006—2007 [J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2008, 29(11): 996-1011
- [28] Bakkali M. Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? [J]. *Archives of Microbiology*, 2013, 195(4): 279-289
- [29] Li F, Alvarez-Martinez C, Chen Y Q, et al. *Enterococcus faecalis* PrgJ, a VirB4-like ATPase, mediates pCF10 conjugative transfer through substrate binding [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(15): 4041-4051
- [30] Huang C C, Al-Saab F, Wang Y D, et al. Scalable high-mobility MoS₂ thin films fabricated by an atmospheric pressure chemical vapor deposition process at ambient temperature [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(21): 12792-12797
- [31] Zou W, Li X Y, Li C H, et al. Influence of size and phase on the biodegradation, excretion, and phytotoxicity persistence of single-layer molybdenum disulfide [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(19): 12295-12306
- [32] Guiney L M, Wang X, Xia T, et al. Assessing and mitigating the hazard potential of two-dimensional materials [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 6360-6377
- [33] Chng E L K, Sofer Z, Pumera M. MoS₂ exhibits stronger toxicity with increased exfoliation [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(23): 14412-14418
- [34] Zhou X F, Jia J B, Luo Z, et al. Remote induction of cell autophagy by 2D MoS₂ nanosheets via perturbing cell surface receptors and mTOR pathway from outside of cells [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(7): 6829-6839
- ◆