



抗生素耐药性的微生物调控: 原生生物对细菌抗生素耐药性的影响

栗利娟^{1,2}, 郝秀丽³, 安新丽¹, 李汶菁^{1,2}, 林晨烁^{1,2}, 朱永官^{1,2,4*}

1. 中国科学院城市环境研究所, 城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 华中农业大学, 农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070;
4. 中国科学院生态环境研究中心, 城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085

* 联系人, E-mail: ygzhu@rcees.ac.cn

2023-04-06 收稿, 2023-06-03 修回, 2023-06-19 接受, 2023-06-20 网络版发表
国家自然科学基金(21936006, 32061143015, 42090063)资助

摘要 抗生素耐药性在环境中的存在、进化和传播对人类健康构成了全球性的威胁。随着抗生素的使用, 我们对人类影响的生态系统中抗生素耐药性的了解正在迅速加深。然而, 在人类干扰有限的自然生态系统中, 微生物的相互作用作为抗生素耐药性进化的主要驱动因素在很大程度上仍被忽视。本文首先综述了抗生素耐药性的起源、进化和传播, 指出前抗生素时代细菌耐药性进化的主要动力是微生物之间对资源的竞争, 而抗生素时代人类活动向环境中施加的高浓度的抗生素则成为细菌耐药性进化的主要动力。然后在个体水平分别梳理了自养型原生生物和吞噬型原生生物在调控细菌耐药性方面的重要作用。并且指出由于方法上的局限性, 目前在群落水平的研究相对缓慢, 了解原生生物在微生物食物网中的地位和影响原生生物群落分布的因素则有利于我们解析其中的机制。最后对利用原生生物遏制抗生素耐药性带来的危害进行了展望, 以期缓解抗生素耐药性并控制其在环境中的传播提供科学依据。

关键词 抗生素抗性基因, 原生生物, 个体水平, 群落水平, 微生物相互作用, 水平基因转移

抗生素的发现和应用使得许多细菌感染问题迎刃而解, 极大地改善了人类的生活和健康状况。然而随着抗生素的长期使用甚至滥用, 抗生素耐药性已经成为全球性的公共卫生问题, 不仅威胁着人类的健康和生命安全, 还对全球卫生和可持续发展目标提出了新的挑战^[1]。作为一种新污染物, 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)既可以通过垂直基因转移(vertical gene transfer, VGT)的方式在细菌之间代代相传, 又可以通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)的方式在不同的细菌之间扩散、传播, 从而在环

境中持久存在。*Lancet*披露, 抗生素耐药性相关死亡已成为全球第三大死因, 2019年495万人的死亡与抗生素耐药性感染有关, 其中127万人直接死于抗生素耐药性^[2]。如果不采取强有力的行动, 到2050年, 全球每年将有近1000万人因抗生素耐药性细菌感染而失去生命, 累计经济损失预计将达到100万亿美元^[3]。为了遏制抗生素耐药性的蔓延, 联合国大会和世界卫生组织于2015年联合发布了《抗微生物药物耐药性全球行动计划》, 并建立了全球抗微生物药物耐药性监测系统^[4]。我国也先后于2016年8月发布了《遏制细菌耐药国家

引用格式: 栗利娟, 郝秀丽, 安新丽, 等. 抗生素耐药性的微生物调控: 原生生物对细菌抗生素耐药性的影响. 科学通报, 2024, 69: 746–758

Li L J, Hao X L, An X L, et al. Microbial regulation of antibiotic resistance: Effects of protists on bacterial antibiotic resistance (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 746–758, doi: [10.1360/TB-2023-0313](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0313)

行动计划(2016~2020)》、2022年10月发布《遏制微生物耐药国家行动计划(2022~2025年)》,旨在通过制定对抗菌药物合理使用的政策和进行引导管理,减缓和遏制抗生素耐药性,维护人民健康和生命安全,实现人类社会的可持续发展。

原生生物(protoist)是除动物、植物和真菌外的真核生物,多为单细胞结构,少数以没有分化出组织的多细胞形式存在,广泛分布于自然界的各种环境中,包括淡水、海水、土壤、沉积物、动植物的体内,甚至极端环境,如火山喷气孔边缘和沙漠等恶劣的环境中^[5,6]。同时,原生生物在微生物生态系统中承担着生产者、消费者和分解者的多重角色,在微生物食物网和生物地球化学循环中发挥着重要作用。许多研究表明,在人类大规模生产使用抗生素前,微生物的相互作用(尤其是捕食和竞争)是抗生素耐药性产生的主要驱动因素^[7-9]。作为细菌的捕食者,原生生物在调控细菌耐药性方面扮演着重要角色,其作用不容忽视^[10]。然而,目前抗生素耐药性的研究集中于细菌,对于原生生物如何调控细菌的群落结构、进而影响细菌携带的抗性组的研究较少。本文将聚焦原生生物与ARGs的主要携带者——细菌之间的相互作用关系,分别在个体和群落水平围绕原生生物与抗生素耐药性之间的关系展开综述,并提出尚未解决的科学问题,以期为进一步开展相关研究提供参考。

1 细菌抗生素耐药性的起源、进化和传播

早在人类开始大规模生产抗生素以预防和治疗传染病之前,许多细菌就进化出了耐受抗生素的能力。400多万年前洞穴^[11]、3万年前的北极冻土^[12]以及其他未受人类活动干扰的地方^[13,14],都检测到了抗生素抗性基因,甚至分离出了可以抵抗14种抗生素的多重耐药细菌,表明在人类使用抗生素之前细菌的抗生素耐药性已经广泛存在,同时也揭示了抗生素耐药性的古老起源。目前认为抗生素耐药性起源古老且仍在持续进化的一个重要驱动因素是微生物之间对资源的竞争^[7-9,15]。因此,抗生素耐药性的进化史可以追溯到人类使用抗生素之前的前抗生素时代^[16]。

前抗生素时代(the pre-antibiotic era)的抗生素耐药性是细菌本身所固有的,称为天然耐药或者固有耐药(intrinsic resistance)^[17]。编码耐药性的基因通常位于细菌的染色体上^[18],在自然选择的压力下进化而来^[17]。为了在资源有限的环境中生存,部分细菌会分泌一些次

级代谢产物(类似于目前被用作药物的抗生素),以抑制其他微生物的生长^[9]。为了防止自身的生命活动被抑制,部分细菌进化成为耐药菌,相关基因可以通过抗生素失活机制、外排泵作用机制和核糖体保护机制使自身免于抗生素的毒害^[19,20]。多项研究表明,目前一些编码抗生素耐药性的基因的原始功能可能与抵御抗生素无关^[18]。例如, β -内酰胺酶可能参与了细菌细胞壁的生物合成^[21],多药外排泵的功能则更加多样,不仅可以使吡啶黄、溴化乙锭和甲苯等对细菌有毒的物质排出胞外,使细菌免于这些物质的毒害^[22,23],而且可以将群体感应(细胞间的一种通讯方式)的信号分子排到胞外,间接影响了细胞间的通讯^[24]。

抗生素的发现标志着人类进入了抗生素时代(the antibiotic era)。1928年Alexander Fleming发现了青霉素,并于20世纪40年代实现了大批量生产^[25]。随后链霉素、四环素和其他抗生素也进入了工业生产阶段^[26]。尽管还无法准确计算抗生素的年生产量及年使用量^[27],但贸易数据显示,在1990年前抗生素的生产呈现指数增加的趋势^[28]。据统计大约30%~90%的抗生素无法被人或动物代谢,又以各种形式排放到环境中^[27]。不同来源土壤中残留的抗生素的浓度差异较大,从 $\mu\text{g/kg}$ 到 mg/kg (干重)不等^[29],相比之下,水体中抗生素的浓度差异较小,浓度通常在 $0.01\sim 1.0\ \mu\text{g/L}$ ^[30-33]。在受人类活动影响的环境中,抗生素浓度远高于自然环境,从而形成了持久的选择压力,加速了抗性基因的进化速度,最终导致对抗生素敏感的细菌乃至病原菌加速进化为耐药菌与耐药性病原菌。Knapp等人^[28]定量分析了1940~2008年间的土壤样品中18种ARGs的丰度,发现土壤中ARGs的丰度逐年增加。这个时期抗性基因进化的主要动力是人类活动向环境中释放的高浓度的抗生素,以获得性耐药为主(acquired resistance)^[17]。这一观点得到了Datta和Hughes^[34]的支持,相关结果表明肠杆菌中的质粒家族,在经抗生素处理后获得了耐药基因。

抗生素时代的到来导致了抗生素的滥用,使得ARGs成为一类新型环境污染物^[35,36],开始在不同的环境介质中传播、扩散^[1,37,38]。Zheng等人^[1]对全球土壤抗性组的研究表明,全球农业土壤中的ARGs丰度显著高于非农业土壤,而人类活动是导致这一现象的主要原因。Munk等人^[38]对全球101个国家污水中的抗性组进行了长达4年的追踪,发现与质粒相关的ARGs序列在亚洲和非洲多个区域都可以检测到,但是与染色体相关的ARGs序列则只分布在特定区域,揭示了水平基因转移

在ARGs传播中的重要性. Zhu等人^[37]对欧洲、北美和中国降雪中的抗性组进行了分析,发现空气污染可能加剧ARGs在降雪中的传播,并且降雪有效地将ARGs从点源传播到地球表面,最终随着被抗性基因污染的空气将其扩散到全球.所以就目前而言,全球的农业土壤、污水和空气都受到了严重的ARGs污染,而人类活动导致的ARGs的水平基因转移是其中的主要动力^[39].

2 原生生物对细菌耐药性的调控:个体水平

2.1 合理利用自养型原生生物有望降低环境中的抗生素耐药性

自养型原生生物,主要分布于不等鞭毛类(Stramenopiles)和原始色素体(Archaeplastidae)中,包括常见的硅藻(Diatoms)、褐藻(Phaeophytes)和金藻(Chrysophytes)等^[5].它们可以通过多种方式降低环境中的抗生素耐药性,如去除环境中的抗生素,产生抗生素的替代物,抑制细菌的群体感应和使ARGs失活等(图1(a))^[40].

具有抗生素去除功能的原生生物通常是一些可以进行光合作用的微藻,它们可以实现抗生素的吸附、富集和降解,减少抗生素在环境中的浓度,降低抗生素耐药性进化的选择压力,使得敏感菌株能够与耐药菌株竞争甚至占据主导地位,从而降低抗生素耐药性的产生和传播^[41-43]. Kiki等人^[44]的研究表明生物降解是自养型原生生物去除抗生素的主要途径,且不同自养型原生生物降解或利用抗生素呈现特异性,主要是通过分泌到细胞外的各种酶将抗生素分解成毒性较低或者无毒的中间产物.生物吸附和生物富集主要是将抗生素结合到微藻的细胞结构上,将其富集起来.最终可以通过去除环境中的微藻(富集了抗生素)来降低环境中抗生素的浓度,但是对抗生素去除的贡献有限.

海藻的提取物中含有多种不易产生耐药性的抗菌化合物,可以作为潜在的抗生素替代物,包括多酚、脂肪酸、甾醇、萜类化合物和色素等^[45-47].与抗生素相比,其合成途径和化学结构往往更加复杂,涉及多个基因的调控和协同作用,具有更多的环结构和手性中心^[48],因此更难被细菌转移和修饰,也更容易产生耐药性,可以有效避免或减缓细菌耐药性的产生,具有重要的临床应用前景^[49]. Selvin和Lipton^[50]证明绿藻提取物具有广谱抗菌活性,对于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有良好的抑菌效果. Marudhupandi和Kumar^[51]发现明褐藻分泌的岩藻多糖具有很强的抑菌能力,可以

对包括霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)等在内的人类病原菌产生抑制作用,有望成为一种抗生素替代物.比如:将藻类及其提取物添加到畜禽饲料中,可以提高动物的健康水平和生产性能,从而减少养殖场抗生素的使用^[52,53].

群体感应(quorum sensing, QS)和抗生素耐药性之间存在着密切的联系^[54,55].这是一种普遍存在于细菌群落中的细胞间通信机制,与细菌群体的细胞密度有关.当细菌群体密度较高时,可以产生大量的小分子信号,激活多种下游细胞过程,如启动耐药机制等,使细菌群体耐受抗生素^[55].当细菌处于群体感应状态时更容易形成生物被膜,可以保护细菌免受抗生素的杀伤,增加对抗生素的耐药性;并且在群体感应状态下细菌之间的联系更加紧密,更容易通过水平基因转移的方式将抗性基因传递给其他细菌,从而导致整个细菌群体对抗生素的耐药性增强^[54].同时处于群体感应状态的细菌还可以调控多重耐药外排泵基因的表达,增加细菌对抗生素的耐药性.因此,群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSI)是降低细菌抗生素耐药性的有效策略之一,可以提高抗生素的杀菌效力和缓解抗生素的耐药性. Tang等人^[55]发现羊栖菜(*Hizikia fusiforme*,一种褐藻)提取物中的褐藻多酚可以与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的信号分子相互作用,阻止其在细菌群体中进行信息传递,破坏生物被膜的形成,促进抗生素增敏,是一种天然的群体感应抑制剂.

多重耐药病原菌是临床上亟待解决的问题,其中多药外排泵是导致细菌抗生素耐药的主要机制之一.通过干扰细菌细胞膜上的药物外排泵,可以阻止抗生素被排出细菌细胞,从而恢复现有抗生素的活性,外排泵抑制剂(efflux pump inhibitors, EPIs)可以发挥这样的功能.迄今为止,大多数已发现的外排泵抑制剂具有芳香结构,而海藻提取物中含有各种萜烯、萜类化合物、酚类化合物、吡啶、吡咯衍生物、生物碱和卤化芳香化合物,为我们寻找外排泵抑制剂指明了方向^[56].例如, Lu等人^[56]利用乙醇提取铜藻的次级代谢产物,发现提取物可以增加大环内酯类药物对大肠杆菌外排泵的抑制作用,进而抑制抗生素耐药性在环境中的传播.

2.2 吞噬型原生生物在细菌抗生素耐药性中的重要角色

吞噬型原生生物(原生动物)可以刺激细菌分泌抗

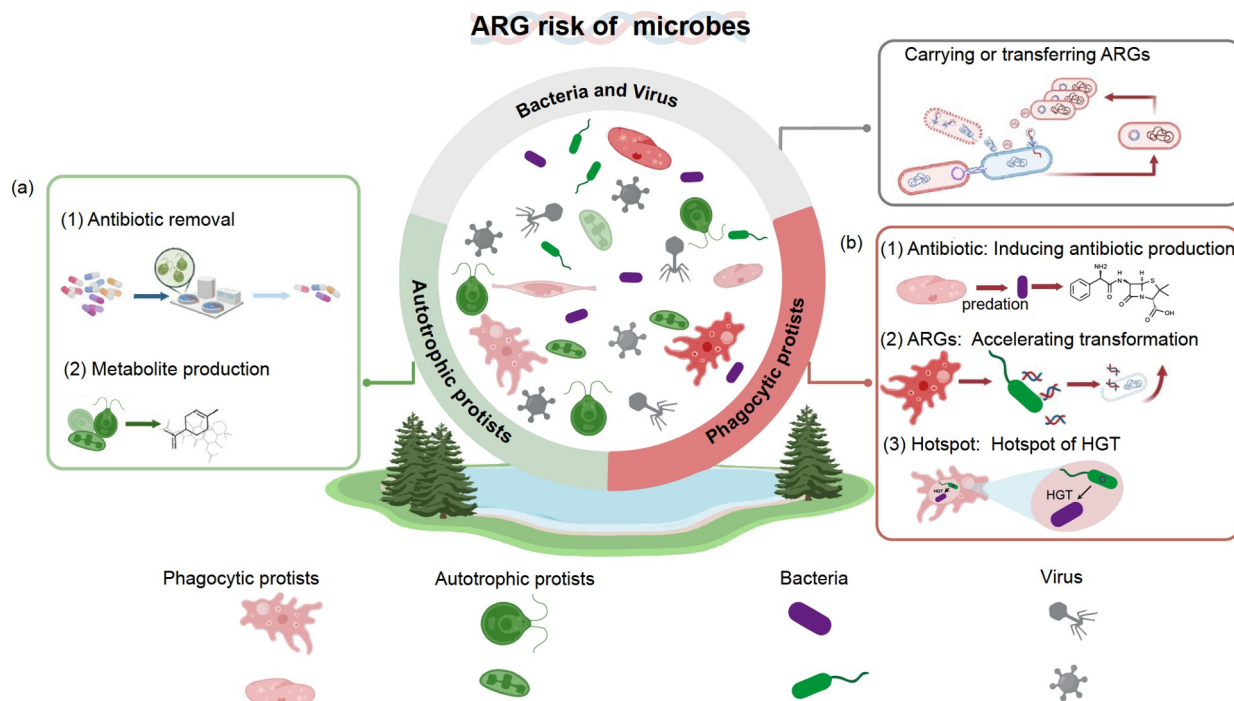


图 1 (网络版彩色)原生生物与细菌耐药性之间的关系(个体水平)^[40]. (a) 自养型原生生物有望降低环境中的抗生素耐药性: (1) 通过生物吸附、生物富集和生物降解去除部分抗生素; (2) 分泌次级代谢产物, 包括抗生素替代物、群体感应抑制剂和外排泵抑制剂等. (b) 吞噬型原生生物在细菌抗生素耐药性中扮演着重要角色: (1) 刺激细菌分泌抗生素; (2) 提高ARGs水平基因转移速率; (3) ARGs发生水平基因转移的场所

Figure 1 (Color online) The relationship between protists and bacterial antibiotic resistance (at the individual level). (a) Autotrophic protists may contribute to the reduction of antibiotic resistance in the environment, including the removal of antibiotics through bioadsorption, bioaccumulation, and biodegradation (1), and the production of secondary metabolites, such as alternatives to antibiotics, quorum sensing inhibitors, and efflux pump inhibitors (2). (b) Phagotrophic protists play an important role in bacterial antibiotic resistance by inducing antibiotic production (1), accelerating the transformation of ARGs (2), and hotspots for horizontal gene transfer of ARGs (3)

生素(图1(b)). 作为食物网的消费者, 原生动物通过捕食以细菌为主的微生物来获取营养, 相应地细菌也进化出了多种抗捕食机制, 如改变细胞形态、形成生物膜、增强运动逃逸能力和分泌有毒的次级代谢产物等^[57,58], 其中分泌抗生素是细菌常见的防御机制之一^[57]. Jousset等人^[59]通过微宇宙实验发现, 变形虫以不产生抗生素2,4-二乙酰基间苯三酚(DAPG)的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)(突变体)为食, 但是无法在含有野生型荧光假单胞菌的体系中存活, 揭示了荧光假单胞菌分泌的抗生素DAPG可以对原生生物产生毒害作用避免其自身被捕食. Jousset和Bonkowski^[60]在随后的实验中阐明了其中的机制: 当变形虫与荧光假单胞菌共培养时, 会将MAPG(DAPG的前体物质)迅速转化成DAPG来应对变形虫的捕食, 使得细菌可以快速适应捕食等生物应激状态. 同样, Mazzola等人^[61]的研究表明, 土壤中的荧光假单胞菌可以分泌环酯肽(cyclic lipopeptide, CLP)以抵御原生动物的捕食作用, 在此过程中与环酯肽合成相关的基因*massA*的表达较细菌单

独培养时显著上调. 当细菌分泌的这些抗生素与环境其他物质相互作用时, 可能会形成复杂的化学环境, 促进抗生素耐药基因的水平转移, 从而导致抗生素耐药性的出现和传播.

原生动物诱导细菌将抗生素耐药基因排放到环境中, 并且在捕食压力下, 可以维持细菌的抗性质粒不被宿主丢失, 在ARGs的水平基因转移中发挥着重要作用(图1(b)). Ishii等人^[62]和Kawabata等人^[63]的研究表明纤毛虫的捕食作用是细菌将可溶性DNA释放到环境中的主要原因. Bien等人^[64]在发光杆菌(*Photobacterium damsela*, 携带含有多重耐药性的接合质粒)与纤毛虫和异养微型鞭毛虫的共培养体系中检测到了抗生素耐药基因*tet(M)*, 随着细菌被捕食, 释放到培养体系中的*tet(M)*丰度越来越高; 并且在整个实验期间, *tet(M)*的结构都可以保持稳定不被降解. Cairns等人^[65,66]发现原生动物捕食增加了机会致病菌黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)携带的抗生素抗性质粒RP4的持久性. 他们通过微宇宙实验揭示即使在没有抗生素压力的情况下,

纤毛虫也能促进质粒发生接合转移, 并防止抗性质粒的丢失^[65]. 因此原生动物的捕食作用在一定程度上促进了ARGs在环境中的传播.

原生动物是ARGs发生水平基因转移的“热区”(图1(b)). 原生动物的吞噬作用会将多种细菌(包括耐药菌)捕获在细胞内, 成为基因的“大熔炉”, 是细菌水平基因转移的重要场所. Schlimme等人^[67]首次证明细菌可以在原生动物的食物泡进行水平基因转移. Matsuo等人^[68]将纤毛虫、供体菌(*E. coli*, 卡那霉素抗性)和受体菌(*E. coli*, 环丙沙星抗性)共培养, 通过激光共聚焦显微镜对供体菌(表达绿色荧光蛋白)和受体菌进行定位追踪(被染色后显微镜下呈现红色). 研究发现, 在纤毛虫的食物泡中可以同时检测到二者的存在, 并且从纤毛虫纯化的囊泡中检测到的细菌的接合频率远高于共培养的悬浮液, 表明同一种属(大肠杆菌*E. coli*)的细菌在原生动物细胞内发生了ARGs的水平基因转移. McCuddin等人^[69]和Matsushita等人^[70]则分别证明原生动物细胞也可以成为不同种属细菌间进行ARGs水平基因转移的场所. 值得注意的是, ARGs在环境中的水平基因转移并非毫无限制, 而是受限于一定的障碍, 其中包括系统发育障碍、生态障碍和功能障碍, 这些限制因素在一定程度上降低了ARGs发生水平基因转移的概率^[71~74]. 然而, 目前相关研究基本局限于细菌-细菌之间, 对于原生生物在其中扮演的角色有待进一步探索^[75,76].

上述研究基本都是在实验室进行的(表1), 因此我们只能根据有限的研究推断: 个体水平上光自养原生生物可能会降低抗生素耐药性, 而异养原生生物可能会促进抗生素耐药性. 但是个体水平研究结果不能代表自然环境中群落水平的实际情况, 因此需要更多的信息来确定原生生物在自然生境中对ARGs的进化和传播的影响, 并确定其潜在的机制.

3 原生生物对细菌耐药性的调控: 群落水平

微生物之间的相互作用是影响抗性组和抗生素耐药性产生和进化的关键因素^[9]. 原生生物作为微生物群落中的生产者、消费者和分解者在群落的构建当中起着至关重要的作用, 它们可以通过捕食直接驱动细菌和真菌群落的变化, 从而进一步影响微生物群落的功能^[5]. 然而, 目前关于原生生物在群落水平上与其他微生物相互作用, 进而影响细菌抗生素耐药性的相关知识相当缺乏^[6,40,58]. 因此, 了解原生生物在微生物食物网中的地位和影响原生生物群落分布的因素, 有助于提高我们预测和管理微生物的能力, 以更好地指导农业生产和减少抗生素的滥用, 这也有助于预防和减缓新的抗生素耐药性的出现.

3.1 目前进展: 相对较少

体型、生活习性和营养方式的巨大差异使得原生

表 1 原生生物对抗生素耐药性的调控(个体水平)

Table 1 Role of protists in regulating antibiotic resistance (individual level)

分类	角色	原生生物	细菌	实验条件	文献
自养型原生生物	去除环境中的抗生素	雨生红球藻/四尾栅藻	/	实验室	[44]
		羊角月牙藻/小球藻	/	实验室	[44]
	产生抗生素的替代物	马尾藻	霍乱弧菌(<i>Vibrio cholera</i>)/伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhi</i>)	实验室	[51]
	分泌群体感应抑制剂	羊栖菜	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	实验室	[55]
	分泌外排泵抑制剂	铜藻	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	实验室	[56]
异养型原生生物	刺激细菌分泌抗生素	变形虫	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	实验室	[61]
		鞭毛虫 / 纤毛虫	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	实验室	[59]
	诱导细菌释放ARGs	纤毛虫	发光杆菌(<i>Photobacterium damsela</i>)	实验室	[64]
	维持抗性质粒不被丢失	纤毛虫	黏质沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i>)	实验室	[65]
		纤毛虫	供体(<i>Escherichia coli</i> , 卡那霉素抗性)→受体(<i>Escherichia coli</i>)	实验室	[68]
	发生HGT 的场所	瘤胃原生动物	供体(<i>Klebsiella</i>)→受体(<i>Salmonella</i>)	实验室	[69]
		纤毛虫	供体(<i>Escherichia coli</i>)→受体(<i>Aeromonas caviae</i>)	实验室	[70]

生物无法像细菌那样采用相对统一的方法对其进行研究^[77-80], 因此在群落水平展开原生生物调控细菌耐药性的研究也更加具有挑战性。然而随着测序技术的普及, 部分学者另辟蹊径, 不再局限于纯培养等传统方法, 而是从测序数据着手并将其与网络分析和结构方程模型等结合起来探索其中的机制^[81-83]。Zhu 等人^[84]对大熊猫肠道的微生物组成和抗性组进行了分析, 通过加权相关网络分析将大熊猫肠道微生物组划分为39个微生物模块, 结果显示模块28和模块30与ARGs丰度显著正相关, 原生生物在这两个模块中占据了重要地位, 揭示它们可能也在塑造大熊猫肠道的抗性组中发挥作用。Li等人^[85]探讨了气候变暖对人工林和自然林生态系统土壤ARGs的影响, 通过构建的结构方程模型发现: 气候变暖背景下, 土壤性质和细菌、真菌和原生生物群落组成的变化可以部分解释ARGs的变化。Li等人^[86]对长期施肥和不施肥的土壤中的原生生物和抗生素耐药性之间的关系进行了分析, 结果显示长期施肥对细菌和真菌群落的多样性和结构没有显著影响, 但是改变了原生生物的组成, 增加了吞噬型原生生物的相对丰度。共现网络分析显示, 原生生物群落组成的变化会导致ARGs组成发生相应的变化。研究者分析可能的原因是: 原生生物是土壤微生物群落的关键基石(key stone), 是微生物食物网的核心, 施肥通过增加细菌的捕食者——吞噬型原生生物的相对丰度, 自上而下(top-down)地影响土壤抗性组的组成(图2)。值得注意的是, 以上基于测序数据开展的研究也有其局限性。首先是对数据有较高的要求, 即需要大量的样本且需覆盖关键环境变量^[83]。其次是得到的结果都是数据驱动的(data-driven), 后续需要湿实验加以验证。

综上, 原生生物在群落水平调控细菌抗生素抗耐药性的研究相当缺乏, 目前仍处于起步阶段。现有研究主要是基于观测到的数据构建相关性网络(network)和结构方程模型, 再据其来推测原生生物对细菌抗生素耐药性产生、进化和传播的贡献。对于其中涉及的机理, 也只是根据前人研究结果进行了推测和讨论, 还没有具体验证, 有待后续学者进一步展开深入研究。

3.2 微生物食物网中的原生生物

自然环境中存在着各种生物, 如细菌、真菌、古菌和原生生物等, 它们之间的相互作用(包括捕食、竞争以及捕食者与被捕食者之间的关系), 也是影响原生

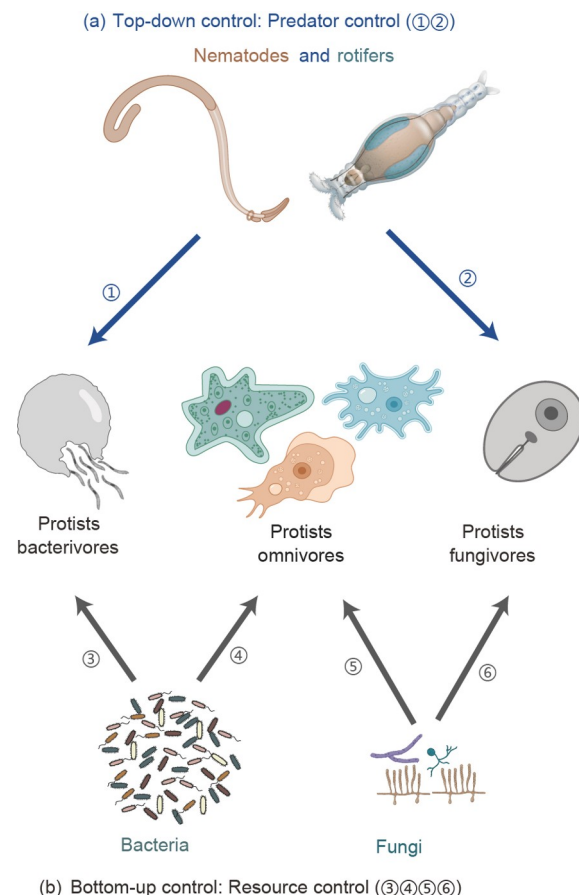


图2 (网络版彩色)原生生物群落受到捕食者自上而下的调控(a)和低营养阶层自下而上的资源限制(b)

Figure 2 (Color online) Top-down versus bottom-up drivers of the protistan microbiome assembly. The Top-down predator control on the protist communities (a) and the bottom-up resource control to the protistan microbiome assembly (b)

生物群落结构的重要因素, 因此了解原生生物在食物网中的位置是十分有必要的。

自养型原生生物承担着全球大约1/4的光合作用, 是生态系统中不可或缺的初级生产者^[80,87], 广泛分布于海洋^[88]、淡水湖泊^[89]和土壤^[90]等多种生境。Singer等人^[89]对28个海洋样品、21个淡水样品和73个土壤样品进行分析, 发现淡水中自养型原生生物丰度最高, 占据原生生物总丰度的49%。其中大多是一些真核藻类, 如褐藻、绿藻、硅藻、鞭毛藻和黄藻等, 它们通常具有光合色素, 通过光合作用合成有机物, 供其生命活动所需, 并通过食物链的形式为生态系统的其他生物提供养分和能量, 进一步支撑了整个生态系统的平衡^[91,92]。

吞噬型原生生物可以通过捕食细菌来获得维持其

生命活动所需的营养(图2③④)。土壤中许多原生生物以细菌为食,这是细菌死亡的主要原因^[93-95]。同样,海洋生态系统中也存在可以捕食细菌的原生生物,它们大多体型较小如纤毛虫和鞭毛虫^[83]。但是原生生物并不是平等地捕食所有猎物,相反它们的捕食行为具有较强的偏好性,且不同种类的原生生物对相同细菌的偏好性也不尽相同^[96,97]。事实上,即使是亲缘关系相近、形态相似的物种对同一细菌的捕食行为也具有差异^[98]。因此,原生生物的摄食行为可以直接影响细菌的种群动态和群落聚集^[99]。

吞噬型原生生物不仅捕食细菌等原核生物,也可以捕食自养型原生生物^[100]、真菌甚至线虫和轮虫等真核生物。Viridiraptoridae是一种可以将真核藻类作为食物来源的有孔虫,其高度特化的细胞骨架可以穿透藻类细胞壁^[101]。虽然最初关于这一现象的报道是基于淡水生态系统的研究,但后续的研究表明这种现象也存在于土壤生态系统中^[87]。按照原生生物是否将真菌作为唯一的食物来源,可以将其分为专性食真菌的原生生物和兼性食真菌的原生生物。纤毛虫Grossglockneriidae属于前者,高度特化的口腔结构使其无法摄取原核生物,只能将真菌作为唯一的食物来源^[102](图2⑥)。兼性食真菌的原生生物通常体型较大(大于100 μm),如“吸血鬼”阿米巴(vampyrellid amoebae)^[103]、Thecamoeba spp.^[104]、有壳变形虫(testate amoebae)^[82]以及eumycetozoans(一种变形虫)^[82,105]等(图2⑤),一方面它们捕食细菌和真菌等低营养级的微生物,另一面也可以通过群体协作捕食比其体型更大的线虫^[83,106]。

3.3 影响原生生物群落分布的生物因子

(1) 自然环境中的生物。食物网的调控方式有两种:自上而下(top-down)和自下而上(bottom-up)。自上而下的调控方式主要依赖于捕食者的压力来控制食物网中被捕食者的数量。而自下而上的调控方式,则是通过限制低营养阶层的资源供应来控制整个食物网生物的数量。原生生物营养方式多样,既是捕食者也是被捕食者,因此既受到线虫和轮虫等高等生物自上而下的调控(图2(a)),也受到细菌和真菌等低等微生物自下而上的影响(图2(b))^[10]。作为原生生物的主要食物源,细菌和真菌的数量和供应率可以调控原生生物的数量和多样性,这种资源限制作用表现出一种自下而上的调控效应^[107];而线虫等高营养级的捕食者,通常体型较大,可

以通过捕食作用控制原生生物的物种丰度和群落结构,表现出自上而下的调控关系^[108]。

(2) 植被类型。原生生物的物种多样性与植被类型紧密相关,植被演替程度越高,对应生境中的原生生物物种越丰富。来自巴西的研究者通过对4种不同类型植被土壤微生物组的研究,揭示随着植被类型的演替,土壤中的原生生物群落也会发生演替,并且随着植被类型不断向更高级的群落演替,原生生物的物种丰富度也在增加^[109]。Jing等人^[79]对长三角进行植被恢复的水生生态系统进行研究,表明植被可以通过产生凋落物和分泌物影响生境中原生生物的丰度和多样性,如改变环境中的溶解有机碳、pH和含氧量等。

3.4 影响原生生物群落分布的环境因子

环境因子,又称为非生物因子,包括水分、温度、盐度和养分等^[10],这些因素直接或间接地影响着原生生物的生长、繁殖、分布和死亡。对于土壤原生生物而言,水分是影响其多样性、密度和种群构成的关键因素^[110,111]。Oliverio等人^[90]对全球六大洲土壤中原生生物的分布进行了大尺度的研究,发现年平均降水是预测原生生物群落的最佳因子。另有研究表明,土壤水分含量的降低会显著减少原生生物的数量,并且体型较大的原生生物通常比体型较小的原生生物更易受到影响^[110]。对于水体生态系统而言,温度和盐度可能是影响海水中原生生物群落多样性和丰度的关键因子^[112],而在贝加尔湖这样的淡水生态系统中原生生物的分布则与湖泊的深度密切相关^[113]。除以上主要因素外,施肥^[114]、重金属、有机污染物^[115]和抗生素^[116]等也都影响着原生生物群落的结构和细胞形态。在干旱胁迫和消毒压力等不良的环境条件下,原生生物会由滋养体状态转变成可以抵抗外界压力的包囊,将自身包裹在封闭的包囊中以逃避外界环境的压力,同时启动自噬机制,通过降解胞内的有机物来维持自身的生命活动^[5,10]。

4 研究展望

尽管原生生物在调控抗生素耐药性方面发挥着重要作用,但相对于其他微生物(尤其是细菌),其相关研究仍处于起步阶段,尚需大量深入的研究。对于相关研究人员,今后在充分利用原生生物以缓解抗生素耐药性并控制其在环境中的传播,可以围绕以下内容展开。

(1) 寻找降低抗生素耐药性的物质:从自养型原生

生物的次级代谢产物中提取抗生素降解酶、抗生素的替代物、群体感应抑制剂和外排泵抑制剂等物质,解析功能物质的结构组成,最终实现工业化生产。

(2) 将原生动物纳入环境监测指标: 作为ARGs的潜在携带者和水平基因转移的重要场所, 原生动物不仅在ARGs的扩散传播中发挥作用, 还可能成为细菌的“训练场”, 进化出可以抵抗多种抗生素的超级耐药菌。因此有必要开展相关研究, 以了解携带耐药菌的原生动物类型, 常见的内生耐药菌及其携带的ARGs, 并将其纳入监测体系, 尤其是医院等环境中, 这对于预防多重耐药细菌构成的威胁是绝对必要的。

(3) 开发新的消毒措施: 作为细菌的宿主, 原生生物

也是ARGs的潜在携带者。目前消毒措施对原生生物(特别是包囊状态的原生生物)杀灭效果有限^[117], 建议在一些关键场所比如饮用水厂等地, 采用能破坏细胞壁多糖聚合物(包囊的主要结构)的消毒技术来杀灭包裹在包囊内的细菌。

(4) 群落水平解析原生生物与抗性组之间的相互调控机制: 自然环境中不是只存在一种细菌, 也不是只存在一种原生生物, 但是目前关于原生生物与抗性组之间的研究基本局限于个体水平, 不足以反应自然环境中二者之间真实的相互调控关系。因此应加强群落水平的相关研究, 解析其中机理, 以更好地指导农业生产和抗生素的使用。

参考文献

- 1 Zheng D, Yin G, Liu M, et al. Global biogeography and projection of soil antibiotic resistance genes. *Sci Adv*, 2022, 8: eabq8015
- 2 Murray C J L, Ikuta K S, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 2022, 399: 629–655
- 3 O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance, 2016
- 4 World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015
- 5 Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, et al. Soil protists: A fertile frontier in soil biology research. *FEMS Microbiol Rev*, 2018, 42: 293–323
- 6 Nguyen B A T, Chen Q L, He J Z, et al. Microbial regulation of natural antibiotic resistance: Understanding the protist-bacteria interactions for evolution of soil resistome. *Sci Total Environ*, 2020, 705: 135882
- 7 Allen H K, Donato J, Wang H H, et al. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8: 251–259
- 8 Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74: 417–433
- 9 Larsson D G J, Flach C F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20: 257–269
- 10 Yao B M, Zeng Q, Zhang L M. Research progress on the biodiversity and ecological function of soil protists (in Chinese). *Biodiver Sci*, 2022, 30: 1–12 [姚保民, 曾青, 张丽梅. 土壤原生生物多样性及其生态功能研究进展. *生物多样性*, 2022, 30: 1–12]
- 11 Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 2012, 7: e34953
- 12 D'Costa V M, King C E, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 2011, 477: 457–461
- 13 Lugli G A, Milani C, Mancabelli L, et al. Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: A genomic tale from the Copper Age. *Microbiome*, 2017, 5: 5
- 14 Perry J, Waglechner N, Wright G. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6: a025197
- 15 Martinez J L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Roy Soc B Biol Sci*, 2009, 276: 2521–2530
- 16 Aminov R I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*, 2010, 1: 134
- 17 Baquero F, Alvarez-Ortega C, Martinez J L. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep*, 2009, 1: 469–476
- 18 Martinez J L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: The two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front Microbiol*, 2012, 3: 1
- 19 Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 2276–2280
- 20 Zhu Y G, Zhao Y, Li B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16270
- 21 Jacobs C, Huang L J, Bartowsky E, et al. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J*, 1994, 13: 4684–4694
- 22 Fernandes P. Solvent tolerance in bacteria: Role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22: 211–216
- 23 Piddock L J V. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 629–636
- 24 Alcalde-Rico M, Olivares-Pacheco J, Alvarez-Ortega C, et al. Role of the multidrug resistance efflux pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2752

- 25 Ligon B L. Penicillin: Its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004, 15: 52–57
- 26 Taubes G. The bacteria fight back. *Science*, 2008, 321: 356–361
- 27 Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 2006, 65: 725–759
- 28 Knapp C W, Dolfing J, Ehler P A I, et al. Evidence of Increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 580–587
- 29 Ben Y, Fu C, Hu M, et al. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environ Res*, 2019, 169: 483–493
- 30 Batt A L, Kim S, Aga D S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere*, 2007, 68: 428–435
- 31 Miao X S, Bishay F, Chen M, et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 3533–3541
- 32 Monteiro S C, Boxall A B A. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. In: Whitacre D M, ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer, 2010. 53–154
- 33 Watkinson A J, Murby E J, Kolpin D W, et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci Total Environ*, 2009, 407: 2711–2723
- 34 Datta N, Hughes V M. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, 1983, 306: 616–617
- 35 Luo Y, Zhou Q X. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants (in Chinese). *Acta Sci Circum*, 2008, 28: 1499–1505 [罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物. *环境科学学报*, 2008, 28: 1499–1505]
- 36 Hu X J, Qin C, Gao Y Z. Organic contaminants influence the horizontal transfer of antibiotic resistance genes (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2022, 67: 4224–4235 [胡小婕, 秦超, 高彦征. 有机污染物对抗生素抗性基因水平转移的影响及机制. *科学通报*, 2022, 67: 4224–4235]
- 37 Zhu G, Wang X, Yang T, et al. Air pollution could drive global dissemination of antibiotic resistance genes. *ISME J*, 2021, 15: 270–281
- 38 Munk P, Brinch C, Møller F D, et al. Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. *Nat Commun*, 2022, 13: 7251
- 39 Zhang T, Li B. Antibiotic resistance in water environment: Frontiers of fundamental research, risk assessment and control strategies (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2020, 65: 2543–2554 [张彤, 李炳. 水环境中抗生素耐药性的科学研究前沿、环境健康风险评估和控制阻断策略. *科学通报*, 2020, 65: 2543–2554]
- 40 Yu Y T, Zhang Z Y, Zhang Q, et al. Protists, unexpected players in waterborne antibiotic resistance? *Rev Environ Contam T*, 2022, 260: 260–278
- 41 Hena S, Gutierrez L, Croué J P. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *J Hazard Mater*, 2021, 403: 124041
- 42 Leng L, Wei L, Xiong Q, et al. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. *Chemosphere*, 2020, 238: 124680
- 43 Xiong Q, Hu L X, Liu Y S, et al. Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. *Environ Int*, 2021, 155: 106594
- 44 Kiki C, Rashid A, Wang Y, et al. Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways. *J Hazard Mater*, 2020, 387: 121985
- 45 Desbois A P, Mearns-Spragg A, Smith V J. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microb Biotechnol*, 2009, 11: 45–52
- 46 Eom S H, Lee D S, Jung Y J, et al. The mechanism of antibacterial activity of phlorofucofuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 9795–9804
- 47 Bhowmick S, Mazumdar A, Moulick A, et al. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnol Adv*, 2020, 43: 107571
- 48 Wright G D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microb Biotechnol*, 2019, 12: 55–57
- 49 Alamgir A N M. Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: Volume 2. In: Rainsford K D, ed. *Progress in Drug Research*. Cham: Springer, 2018
- 50 Selvin J, Lipton A P. Biopotentials of ulva fasciata and hypnea musciformis collected from the Peninsular Coast of India. *J Mar Sci Tech*, 2004, 12: 1
- 51 Marudhupandi T, Kumar T T A. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *Int Curr Pharm J*, 2013, 2: 156–158
- 52 Falaise C, François C, Travers M A, et al. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Mar Drugs*, 2016, 14: 159

- 53 Nagarajan D, Varjani S, Lee D J, et al. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae—Nutritive value and techno-functional components. *Renew Sustain Energy Rev*, 2021, 150: 111549
- 54 Lyons T, Gahan C G, O'Sullivan T P. Structure-activity relationships of furanones, dihydropyrrolones and thiophenones as potential quorum sensing inhibitors. *Future Medicinal Chem*, 2020, 12: 1925–1943
- 55 Tang J, Wang W, Chu W. Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of phlorotannins from seaweed (*Hizikia fusiforme*). *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 586750
- 56 Lu W J, Lin H J, Hsu P H, et al. Brown and red seaweeds serve as potential efflux pump inhibitors for drug-resistant *Escherichia coli*. *Evid-based Complement Altern Med*, 2019, 2019: 1836982
- 57 Matz C, Kjelleberg S. Off the hook—How bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol*, 2005, 13: 302–307
- 58 Amaro F, Martín-González A. Microbial warfare in the wild—The impact of protists on the evolution and virulence of bacterial pathogens. *Int Microbiol*, 2021, 24: 559–571
- 59 Jousset A, Lara E, Wall L G, et al. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 7083–7090
- 60 Jousset A, Bonkowski M. The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42: 1647–1649
- 61 Mazzola M, de Bruijn I, Cohen M F, et al. Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 6804–6811
- 62 Ishii N, Kawabata Z, Nakano S, et al. Microbial interactions responsible for dissolved DNA production in a hypereutrophic pond. *Hydrobiologia*, 1998, 380: 67–76
- 63 Kawabata Z, Ishii N, Nasu M, et al. Dissolved DNA produced through a prey-predator relationship in a species-defined aquatic microcosm. *Hydrobiologia*, 1998, 385: 71–76
- 64 Bien T L T, Thao N V, Kitamura S I, et al. Release and constancy of an antibiotic resistance gene in seawater under grazing stress by ciliates and heterotrophic nanoflagellates. *Microbes Environ*, 2017, 32: 174–179
- 65 Cairns J, Jalasvuori M, Ojala V, et al. Conjugation is necessary for a bacterial plasmid to survive under protozoan predation. *Biol Lett*, 2016, 12: 20150953
- 66 Cairns J, Koskinen K, Penttinen R, et al. Black queen evolution and trophic interactions determine plasmid survival after the disruption of the conjugation network. *mSystems*, 2018, 3: e00104-18
- 67 Schlimme W, Marchiani M, Hanselmann K, et al. Gene transfer between bacteria within digestive vacuoles of protozoa. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, 23: 239–247
- 68 Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, et al. Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol*, 2010, 161: 711–719
- 69 Mccuddin Z, Carlson S, Rasmussen M, et al. Klebsiella to Salmonella gene transfer within rumen protozoa: Implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. *Vet Microbiol*, 2006, 114: 275–284
- 70 Matsushita M, Okubo T, Hasegawa T, et al. *Tetrahymena* promotes interactive transfer of carbapenemase gene encoded in plasmid between fecal *Escherichia coli* and environmental *Aeromonas caviae*. *Microbiol Immunol*, 2018, 62: 720–728
- 71 Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 711–721
- 72 Sorek R, Zhu Y, Creevey C J, et al. Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science*, 2007, 318: 1449–1452
- 73 Popa O, Dagan T. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14: 615–623
- 74 Sommer M O A. Barriers to the spread of resistance. *Nature*, 2014, 509: 567–568
- 75 Acar Kirit H, Bollback J P, Lagator M. The role of the environment in horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 2022, 39: msac220
- 76 Baquero F, Coque T M, Guerra-Pinto N, et al. The influence of coalescent microbiotic particles from water and soil on the evolution and spread of antimicrobial resistance. *Front Environ Sci*, 2022, 10: 824963
- 77 Yi Z Z, Miao M, Gao S, et al. On molecular biology of ciliated protozoa: Frontier areas and progresses (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 2227–2238 [伊珍珍, 苗苗, 高珊, 等. 纤毛虫原生动物的分子生物学研究: 若干热点领域及新进展. 科学通报, 2016, 61: 2227–2238]
- 78 Geisen S, Mitchell E A D, Wilkinson D M, et al. Soil protistology rebooted: 30 Fundamental questions to start with. *Soil Biol Biochem*, 2017, 111: 94–103
- 79 Jing Z, Li Q, Wei Y, et al. Mechanistic insights into dissolved organic matter-driven protistan and bacterial community dynamics influenced by vegetation restoration. *Environ Res*, 2023, 227: 115710
- 80 Wei Z, Song Y Q, Xiong W, et al. Soil protozoa: Research methods and roles in the biocontrol of soil-borne diseases. *Acta Pedol Sin*, 2021, 58: 14–22 [韦中, 宋宇琦, 武熊, 等. 土壤原生动物——研究方法及其在土传病害防控中的作用. 土壤学报, 2021, 58: 14–22]

- 81 Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, et al. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 2015, 348: 1262073
- 82 Wilkinson D M, Mitchell E A D. Testate amoebae and nutrient cycling with particular reference to soils. *Geomicrobiol J*, 2010, 27: 520–533
- 83 Worden A Z, Follows M J, Giovannoni S J, et al. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*, 2015, 347: 1257594
- 84 Zhu D, Lu L, Zhang Z, et al. Insights into the roles of fungi and protist in the giant panda gut microbiome and antibiotic resistome. *Environ Int*, 2021, 155: 106703
- 85 Li Z, Sun A, Liu X, et al. Climate warming increases the proportions of specific antibiotic resistance genes in natural soil ecosystems. *J Hazard Mater*, 2022, 430: 128442
- 86 Li H Z, Zhu D, Sun A Q, et al. Effects of soil protists on the antibiotic resistome under long term fertilization. *Environ Pollut*, 2022, 307: 119516
- 87 Seppely C V W, Singer D, Dumack K, et al. Distribution patterns of soil microbial eukaryotes suggests widespread algivory by phagotrophic protists as an alternative pathway for nutrient cycling. *Soil Biol Biochem*, 2017, 112: 68–76
- 88 de Vargas C, Audic S, Henry N, et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 2015, 348: 1261605
- 89 Singer D, Seppely C V W, Lentendu G, et al. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environ Int*, 2021, 146: 106262
- 90 Oliverio A M, Geisen S, Delgado-Baquerizo M, et al. The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems. *Sci Adv*, 2020, 6: eaax8787
- 91 Caron D A, Alexander H, Allen A E, et al. Probing the evolution, ecology and physiology of marine protists using transcriptomics. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 6–20
- 92 Adl M S, Gupta V S. Protists in soil ecology and forest nutrient cycling. *Can J For Res*, 2006, 36: 1805–1817
- 93 Hunt H W, Coleman D C, Ingham E R, et al. The detrital food web in a shortgrass prairie. *Biol Fertil Soils*, 1987, 3: 57–68
- 94 de Ruiter P C, Neutel A M, Moore J C. Energetics, patterns of interaction strengths, and stability in real ecosystems. *Science*, 1995, 269: 1257–1260
- 95 Clarholm M. Soil protozoa: An under-researched microbial group gaining momentum. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37: 811–817
- 96 Singh B N. Selectivity in bacterial food by soil amoebae in pure mixed culture and in sterilized soil. *Ann Appl Biol*, 1941, 28: 52–64
- 97 Singh B N. Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae. *Ann Appl Biol*, 1942, 29: 18–22
- 98 Glücksman E, Bell T, Griffiths R I, et al. Closely related protist strains have different grazing impacts on natural bacterial communities. *Environ Microbiol*, 2010, 12: 3105–3113
- 99 Huenninghaus M, Koller R, Kramer S, et al. Changes in bacterial community composition and soil respiration indicate rapid successions of protist grazers during mineralization of maize crop residues. *Pedobiologia*, 2017, 62: 1–8
- 100 Wang W P, Gao X F, Chen H H, et al. Spatial-temporal variation of *Netzelia tuberspinifera* population density and morphometric characteristics in China and its driving factors (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2022, 67: 85–98 [王文平, 高肖飞, 陈辉煌, 等. 中国瘤棘奈氏虫种群密度和形态特征的时空差异及其影响因素. 科学通报, 2022, 67: 85–98]
- 101 Busch A, Hess S. The cytoskeleton architecture of algivorous protoplast feeders (Viridiraptoridae, Rhizaria) indicates actin-guided perforation of prey cell walls. *Protist*, 2017, 168: 12–31
- 102 Petz W, Foissner W, Adam H. Culture, food selection and growth rate in the mycophagous ciliate *Grossglockneria acuta* Foissner, 1980: First evidence of autochthonous soil ciliates. *Soil Biol Biochem*, 1985, 17: 871–875
- 103 Hess S, Sausen N, Melkonian M. Shedding light on vampires: The phylogeny of vampyrellid amoebae revisited. *PLoS One*, 2012, 7: e31165
- 104 Page F C. The genus *Thecamoeba* (Protozoa, Gymnamoebia) Species distinctions, locomotive morphology, and protozoan prey. *J Nat History*, 1977, 11: 25–63
- 105 Stephenson S L, Feest A. Ecology of soil eumycetozoans. *Acta Protozool*, 2012, 51: 201–208
- 106 Geisen S, Tveit A T, Clark I M, et al. Metatranscriptomic census of active protists in soils. *ISME J*, 2015, 9: 2178–2190
- 107 Geisen S. The bacterial-fungal energy channel concept challenged by enormous functional versatility of soil protists. *Soil Biol Biochem*, 2016, 102: 22–25
- 108 Geisen S, Koller R, Hünninghaus M, et al. The soil food web revisited: Diverse and widespread mycophagous soil protists. *Soil Biol Biochem*, 2016, 94: 10–18
- 109 de Araujo A S F, Mendes L W, Lemos L N, et al. Protist species richness and soil microbiome complexity increase towards climax vegetation in the Brazilian Cerrado. *Commun Biol*, 2018, 1: 135
- 110 Stefan G, Cornelia B, Jörg R, et al. Soil water availability strongly alters the community composition of soil protists. *Pedobiologia*, 2014, 57: 205–213
- 111 Bates S T, Clemente J C, Flores G E, et al. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *ISME J*, 2013, 7: 652–659
- 112 Armeli Minicante S, Piredda R, Quero G M, et al. Habitat heterogeneity and connectivity: Effects on the planktonic protist community structure at

- two adjacent coastal sites (the Lagoon and the Gulf of Venice, Northern Adriatic Sea, Italy) revealed by metabarcoding. [Front Microbiol](#), 2019, 10: 2736
- 113 David G M, Moreira D, Reboul G, et al. Environmental drivers of plankton protist communities along latitudinal and vertical gradients in the oldest and deepest freshwater lake. [Environ Microbiol](#), 2021, 23: 1436–1451
- 114 Sun A, Jiao X Y, Chen Q, et al. Fertilization alters protistan consumers and parasites in crop-associated microbiomes. [Environ Microbiol](#), 2021, 23: 2169–2183
- 115 Wu C, Chao Y, Shu L, et al. Interactions between soil protists and pollutants: An unsolved puzzle. [J Hazard Mater](#), 2022, 429: 128297
- 116 Nguyen B A T, Chen Q L, He J Z, et al. Oxytetracycline and ciprofloxacin exposure altered the composition of protistan consumers in an agricultural soil. [Environ Sci Technol](#), 2020, 54: 9556–9563
- 117 He Z, Wang L, Ge Y, et al. Both viable and inactivated amoeba spores protect their intracellular bacteria from drinking water disinfection. [J Hazard Mater](#), 2021, 417: 126006

Summary for “抗生素耐药性的微生物调控: 原生生物对细菌抗生素耐药性的影响”

Microbial regulation of antibiotic resistance: Effects of protists on bacterial antibiotic resistance

Lijuan Li^{1,2}, Xiuli Hao³, Xinli An¹, Wenjing Li^{1,2}, Chenshuo Lin^{1,2} & Yongguan Zhu^{1,2,4*}

¹ Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

⁴ State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

* Corresponding author, E-mail: ygzhu@rcees.ac.cn

Since Alexander Fleming's discovery of penicillin in 1928, numerous antibiotics have been discovered and produced industrially. Approximately, 30% to 90% of antibiotics cannot be absorbed by humans and animals and, are released into the environment in different forms. As a result, antibiotics are much more concentrated in human-affected environments than in natural environments, forming a pervasive selection pressure and accelerating the evolution and emergence of antibiotic resistance genes (ARGs). With ongoing research, we are gradually gaining more insights into how human activities impact ARGs. However, in natural environments with little anthropogenic disturbance, microbial interactions are the main drivers of antibiotic resistance, which have been largely overlooked. Protists are central to a wide array of food web processes and biogeochemical cycles, and deserve more attention. It is well documented that protists prey on bacteria, the main carriers of ARGs. Thus, protists can indirectly affect resistome by changing bacterial community structure through predation. Likewise, antibiotics are secreted by bacteria as a means of avoiding predation by protozoa, increasing the selective pressure on the environment. Therefore, understanding the relationship between protists and bacterial antibiotic resistance will help us improve the ability to predict and manage microbes to better guide agricultural production, reduce antibiotic overuse and prevent or mitigate the emergence of new antibiotic resistance.

This paper first introduces the origin, evolution and spread of antibiotic resistance, and then summarizes that the main factors driving its evolution vary from the pre-antibiotic era to the antibiotic era. In the second section, this paper reviews that autotrophic protists may contribute to the reduction of antibiotic resistance: (1) By bioadsorption, bioaccumulation, and biodegradation, autotrophic protists can remove antibiotics from the environment, reducing selection pressure and slowing the speed of evolution; (2) autotrophic protists can secrete some secondary metabolites, including alternatives to antibiotics, quorum sensing inhibitors, and efflux pump inhibitors, all of which contribute to reducing antibiotic resistance. Besides, phagocytic protists also play an important role. In addition to serving as the hotspot for horizontal gene transfer (HGT), they also stimulate bacteria to secrete antibiotics through predation and increase the frequency of HGT between different bacteria. Since individual level studies do not represent the actual situation of communities in natural environments, research on the community level is required. Therefore, the third section is focused on the community level. Protists display a myriad of sizes, morphologies and nutritional modes, making it difficult to study them with the traditional method. The ultra-deep high-throughput sequencing combined with statistical approaches provides new insights into the conundrum of how protists regulate bacterial antibiotic resistance at the community level. It is noteworthy that studies based on sequencing data also have their limitations. First of all, data requirements are high, that is, a large number of samples and key environmental variables need to be covered. Secondly, the results are data-driven and need to be verified by other experiments. The last section discusses perspectives regarding the role of protists in preventing and controlling the risk of bacterial antibiotic resistance: (1) Screening secondary metabolites from autotrophic protists, searching for substances that can reduce antibiotic resistance, and realizing industrial production; (2) protists should be considered as one of the indicators of environmental monitoring, especially in hospitals, preventing intracellular bacteria from becoming super-resistant bacteria via HGT; (3) it is necessary to develop novel disinfection techniques to kill antibiotic resistant bacteria protected by protist cysts; and (4) the regulating mechanisms between protists and bacterial antibiotic resistance should be explored at the community level.

antibiotic resistance genes, protist, individual level, community level, microbial interaction, horizontal gene transfer

doi: [10.1360/TB-2023-0313](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0313)