

鱼类病原菌中 R⁺ 质粒的检出及其特性

李 爱 华

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 本文研究了5个属的15株鱼类病原菌对17种抗菌药物的耐药性。其中,对β-内酰胺类和红霉素的耐药率最高,对妥布霉素最敏感。以 *E. coli* K-12 RC85 为受体菌,鱼类病原菌为供体菌,采用细菌接合试验,从耐氨基青霉素、四环素和磺胺的嗜水气单胞菌 CJ26 株中检测到一株耐四环素和磺胺的可自身传递的 R 质粒 pWH9601。它对四环素的抗性可被四环素类药物所诱导。pWH9601 上的耐药基因在供体菌和受体菌中的表达水平有所不同。该质粒可在 37℃ 下,15min 内通过接合方式,转移到 *E. coli* K-12 RC85 中,而且这种转移在 12℃ 的条件下也可进行。

关键词 R 质粒, 耐药性, 鱼类病原菌

自 1959 年日本学者证实耐药性质粒 (Resistance Plasmid) 以来, 耐药质粒在介导细菌耐药性中的作用已愈来愈受到重视。1971 年 Aoki 等^[1,2], 通过接合试验, 从 *Aeromonas salmonicida* 和 *A. liquefaciens* 中检出可自身传递的耐药质粒, 这是鱼类病原菌中耐药质粒研究的最早报道。此后相继从其它病原菌中检出耐药质粒, 包括 *Edwardsiella ictaluri*^[3]、*Pasteurella piscicida*^[4]、*Pseudomonas fluorescens*^[5] 和 *marine Vibrio*^[5] 等。耐药质粒在养殖水体中的流行, 已成为目前鱼病防治中的突出问题。

质粒介导的耐药性可通过垂直和水平传播的方式进行广泛传播, 成为耐药菌增多的主要原因。通过对耐药质粒深入的研究有助于阐明耐药机理、提出控制耐药菌出现或流行的对策。目前, 在我国尚无有关鱼类病原菌耐药质粒的研究报道。鉴于有研究认为^[6], 来自鱼类病原菌的 R 质粒, 其性质与来自人和家畜病原菌的 R 质粒不同, 不同地域之间分离到的 R 质粒也有所不同^[7], 为此, 我们研究了 15 株病原菌的耐药性, 并从中检出了一株耐四环素和磺胺药的 R 质粒, 对其生物学特性的研究, 为以后从分子水平研究其耐药机理打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株 15 株鱼类病原菌。其中 11 株由本实验室分离、保存; 4 株由浙江水产研究所的陈月英和长春兽医大学王振英惠赠。15 株试验菌中, *Aeromonas hydrophila* 6 株、

中国科学院院长择优基金

1997-01-23收到; 1997-05-21修回。

Pseudomonas 2 株、*Vibrio* 3 株、*Yersinia* 3 株、*Edwardsiella tarda* 1 株。*E. coli* K-12 RC85^[8]、*E. coli* K-12 HB101^[9]均由日本的 Aoki 博士惠赠。

1.2 培养基 LB 培养基用于菌株的活化、接合实验时的混合培养。M-H 培养基用于纸片法测定细菌对抗菌药物的敏感度。MacConkey 琼脂加入相应的抗菌药物, 用于选择接合子。基础培养基用于菌株营养缺陷型的鉴定。

1.3 药物 萍啶酸 (Nal)、氯霉素、四环素 (Tc) (均为 Serva 产品)、链霉素、SMZ (江西黎民制药厂)。使用浓度分别为: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。采用标准纸片法测定各分离菌对 17 种药物的敏感性。含药纸片为上海临床检验中心产品。

1.4 耐药质粒的检测 参照 Aoki 等的方法^[8]进行。以鱼类病原菌为供体菌, *E. coli* K-12 RC85、HB101 为受体菌。另将供体菌培养液用 0.45 μm 的滤膜过滤, 将此滤液作为供体菌液, 按上述同样方法进行接合试验。

1.5 接合子抗性水平的变化 经过上述质粒检测试验, 获得两株接合子 RC85 (R⁺)、HB101 (R⁺)。然后, 将这两种接合子、含有耐药质粒的嗜水气单胞菌 CJ26 株及受体菌 RC85、HB101, 以琼脂平板稀释法, 测定它们对几种药物的耐药水平。了解其耐药标记及耐药质粒在不同宿主中抗性水平的变化。以含 R 质粒的 CJ26 或 CJ26 与 HB101 的接合子作为供体菌, 以 RC85、一株鳗弧菌、一株假单胞菌为受体菌, 按上述方法, 进行质粒的接合转移试验。

1.6 接合试验的温度对转移频率的影响 将等量 OD 值为 0.4 的供体菌和受体菌菌液混合后, 分成 4 管, 分别置于 12℃、20℃、30℃ 和 37℃ 温箱中培养 18h, 作适当稀释后, 取 0.1ml 涂布选择平板, 统计转移频率。将供体菌和受体菌菌液混合后, 置于 37℃ 水浴箱中培养, 0.5、1、2、4、18、24h 后取出, 适当稀释后涂布选择平板。计算其接合转移频率。另外, 四环素抗性的诱导试验参照文献 [10] 的方法进行。溴化乙啶对质粒的消除及质粒稳定性研究参照 Toranzo 等^[11]和薛广波等^[12]的方法进行。

2 结果

2.1 15 株试验菌对 17 种抗菌药物的耐药频率见表 1。

2.2 嗜水气单胞菌 CJ26 株与 RC85 接合后, 在选择性 MacConkey 平板上可长出红色菌落。这就是接受了耐药质粒的 RC85, 即接合子。而 CJ26 或 RC85 单独涂布或两者混合后立即涂布于同样的平板上均无菌落出现。接合子纯化后, 经营养缺陷型鉴定与 RC85 的缺陷型相同, 只是增加了供体菌 CJ26 所具有的两种耐药表型, 即接合子同时具有 Nal、Tc 和 SMZ 三种抗性。菌株 CJ26 的无菌滤液与 RC85 接合, 无接合子出现。采用同样的方法, 供体菌 CJ26 也可将两种抗性传递给受体菌 HB101。将这株耐药质粒命名为 pWH9601。从其它 14 株细菌中未检测到可自身传递的 R 质粒。菌株 CJ26 具有氨苄青霉素 (Amp)、四环素 (TC)、磺胺 (SMZ) 等三种抗性标记。其中的 Amp 抗性不能通过接合方式转移到受体菌, 说明其编码基因定位于染色体上。

2.3 CJ26 和 RC85 混合后于 37℃ 水浴箱中培养。接合转移频率随接合时间的延长而增大。最快在培养 15min 后即可出现接合子。在含四环素的平板上出现的接合子显著多于含 SMZ 平板上出现的接合子, 而且前者较后者的菌落大。如培养超过 30min, 在两种平板

表1 15株鱼类病原菌对17种药物的耐药频率

Tab.1 Frequency of antibiotic resistance among 15 fish pathogens against 17 antibacterial agents

药物 Agents	每片含药量 Dose per disk (μ g)	耐药菌的MIC MIC of resistant isolates($\geq \mu$ g/ml)	耐药菌的比例	
			Resistant isolates	
			of all tested strains	of A. hydrophila
Penicillin G	10U	4	14/15	6/6
Ampicillin	10	4	13/15	6/6
Erythromycin	15	8	12/15	4/6
Carbenicillin	100	64/512*	12/15	6/6
Cephalothin	30	32	10/15	4/6
Vancomycin	30	32	10/15	3/6
Cefazolin	30	32	8/15	3/6
Streptomycin	10	15	4/15	0/6
Amikacin	30	32	4/15	0/6
Sulfonamide	300	350	2/15	2/6
Chloramphenicol	30	32	3/15	1/6
TMP/SMZ	25	160	2/15	1/6
Tetracycline	30	16	2/15	1/6
Kanamycin	30	25	2/15	0/6
Neomycin	30	10	2/15	0/6
Gentamicin	10	8	2/15	0/6
Tobromycin	10	8	0/15	0/6

* 512 μ g/ml: MIC for *psedomonas*; 64 μ g/ml: MIC for other strains表2 不同接合时间R质粒从 *A. hydrophila* CJ26 转移到 *E. coli* RC85中的频率Tab.2 Frequency of transfer of R Plasmid from *A. Hydrophila* to *E. coli* RC85 after various conjugation periods

选择培养基中所含 的药物	接合间隔时间					
	Conjugation interval					
Drugs in selective media	0.25h	0.5h	1h	2h	18h	24h
SMZ+Nal	7.1×10^{-6}	4.3×10^{-5}	2.0×10^{-4}	3.2×10^{-4}	2.7×10^{-2}	1.0×10^{-1}
TC+Nal	1.2×10^{-5}	4.4×10^{-5}	3.1×10^{-4}	3.5×10^{-4}	1.9×10^{-2}	7.6×10^{-2}

注: SMZ Sulfamethoxazole; TC Tetracycline; Nal Nalidixic acid

上出现的接合子数目及菌落形态相近(表2)。

CJ26 和 RC85 混合后, 分别置于 12℃、20℃、30℃ 和 37℃ 下培养, 结果发现, 在 12℃ 时, 质粒仍可发生转移, 但转移频率很低(表3)。而在 20℃ 时, 转移明显升高。在 30℃ 和 37℃ 时, 接合转移频率无大的差别。

耐药质粒在不同的宿主中, 编码的耐药水平是不相同的。四环素对 *A. hydrophila* CJ26 的 MIC 低于对 *E. coli* 的 MIC。而 SMZ 的情形则刚好相反, 质粒在 *A. hydrophila* CJ26 中的表达水平高于在 *E. coli* 中的表达水平(表4)。

2.4 以 CJ26 与 HB101 的接合子作供体菌, 以 RC85 作受体菌, 结果 RC85 也同样获得了对

表3 接合温度对R质粒转移频率的影响

Tab.3 Effect of mating temperature on transfer frequency of R plasmid (for 18h)

选择培养基中所含的药物	接合温度			
	Mating temperature			
Drugs in selective media	12℃	20℃	30℃	37℃
SMZ+Nal	3.3×10^{-8}	3.9×10^{-4}	9.6×10^{-3}	2.7×10^{-2}
TC+Nal	5.0×10^{-8}	4.0×10^{-4}	7.2×10^{-3}	1.9×10^{-2}

表4 SMZ、TC、对CJ26、RC85、HB101及接合子的最低抑菌浓度

Tab.4 Minimum inhibitory concentration of SMZ and TC against CJ26, RC85, HB101 and transconjugants ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

药物	菌株				
	Strains				
Drugs	CJ26	RC85	HB101	RC85(R^+)	HB101(R^+)
SMZ	>1000	1.6	62	500	500
TC	50	0.4	0.4	200	200

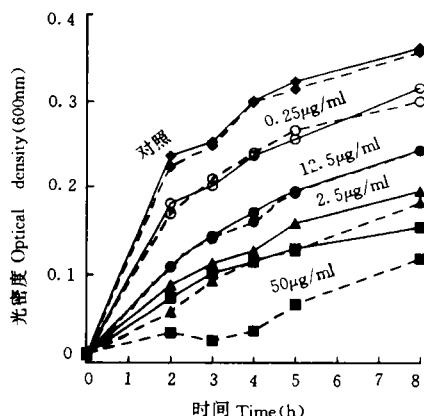


图1 四环素对耐药质粒 pWH9601 的诱导试验

Fig.1 Induction test on pWH9601 with tetracycline.

细菌在 LB 培养基中于 37℃ 下培养。经 (—) $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素诱导和未经 (--) 四环素诱导。
Cells were grown in LB broth at 37℃ with (—) and without (--) induction

SMZ 和 Tc 的抗性。而将 CJ26 及含耐药质粒 pWH9601 的 HB101 分别作为供体菌, 以一株假单胞菌和一株鳗弧菌作为受体菌, 却未能检出接合子。由于没有找到带有适当耐药标记的 *A. hydrophila* 作为受体菌, 因此, 尚不清楚质粒 pWH9601 能否在 *A. hydrophila* 其它株中传播。

2.5 用 $0.05\text{mg}/\text{ml}$ 、 $0.02\text{mg}/\text{ml}$ 的 EB 对 CJ26 处理 24h 后, SMZ 敏感株的比例分别为 $3/126$ 和 $1/128$ 。这一比例大大低于 $0.05\text{mg}/\text{ml}$ 的 EB 对痢疾杆菌中 R 质粒的消除率^[12]。未经 EB 处理的对照菌中未检出 R 质粒消除的敏感株。这说明, 该耐药质粒在原宿主菌中稳定。

2.6 根据 R 质粒的四环素耐药决定子的耐药水平能否被亚抑制浓度的四环素类药物所诱导, 可将其分为可诱导和不可诱导两种类型。根据图 1, 按 Aoki 等的方法^[10], 可以认为质粒 pWH9601 属于可诱导型。

3 讨论

供体菌 CJ26 与受体菌混合培养后, 涂布选择性平板, 长出接合子, 这种接合子经营养缺陷标记鉴定, 证实和受体菌相同。受体菌获得了供体菌的部分抗性(抗 SMZ 和 TC)。这说明编码这两种抗性的基因, 已从供体菌转移到受体菌。由于供体菌和受体菌都是 F^- 型菌株, 两种细菌的染色体基因是不可能发生转移的。特别是, 以重组缺陷型变异株 HB101 作为受体菌时, 同样可以检出接合子。这表明, 在供体菌和受体菌的混合过程中, 耐药基

因的转移只能是由于耐药质粒转移的缘故。CJ26 菌液的超滤液, 与受体菌混合无接合子出现, 说明耐药基因并不存在于细菌分泌物中。鉴于 CJ26 的两种抗性在转移到 HB101 并继续转移到 RC85 的过程中, 总是同时发生, 而且在 EB 的消除试验中, 两种耐药表型又是同时消失, 因此可以认为相应的两种耐药基因可能定位于同一质粒上。当然, 这将有待下一步通过质粒提取和转化试验加以证实。不过, 来自日本的许多研究表明, 鱼类病原菌的 R 质粒上, 编码磺胺和四环素的两种抗性基因连锁出现率非常高^[9, 13, 14], 这是一种非常有趣的现象。

R 质粒 pWH9601 从菌株 CJ26 通过接合传递到大肠杆菌 *E. coli* K-12 RC85 的效率是很高的。接合 24h 后, 转移频率高达 1.0×10^{-1} 。这一结果与 Aoki 等^[15]报道的结果相近。而 Kim 等报道^[13], 有的 R 质粒从 *P. piscicida* 转移到 *E. coli* K-12 RC85 中的频率高达 5×10^{-1} 。接合 15min 后, 耐药性即可出现转移。接合时温度在 25℃ 以上时, 对接合频率影响不明显。接合温度在 20℃ 时, 其转移频率低于 25℃ 以上时的转移频率, 但当接合温度为 12℃ 时, 仍可以发生耐药质粒的转移。可见, 耐药质粒在传播耐药性方面, 危害是相当大的。关于质粒接合转移的最短时间及在 12℃ 低温情况下接合情况, 尚无其他学者的报道。R 质粒 pWH9601 在不同细菌间的转移频率不同, 与选择药物也有关系。耐药质粒在不同的宿主中, 编码的耐药水平不相同。

接合 0.25h, 在含 TC 的选择平板上的接合子数远远多于在 SMZ 平板上的接合子数。且在含 SMZ 平板上的接合子生长不良。这可能是由于 TC 抗性基因和 SMZ 抗性基因位于同一质粒上, 而且 TC 抗性基因离质粒的转移起点较近, 而 SMZ 抗性基因离转移起点较远。由于接合时间太短, 导致许多质粒中的 SMZ 抗性基因转移不完全, 致使该基因不能完全表达所致。

参 考 文 献

- [1] Aoki T et al. Detection of resistance factors in fish pathogen *A. liquefaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, **65**: 343—349
- [2] Aoki T et al. Detection of R factors in naturally occurring *A. salmonicida* strains. *Appl. Microbiol.*, 1971, **22**: 716—717
- [3] Waltman W D et al. Development and transfer of plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Edwardsiella ictaluri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1989, **46**: 114—1117
- [4] Aoki T et al. Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium, *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.*, 1985, **8**: 345—350
- [5] Aoki T. Drug-resistant plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sciences*, 1988, **5**: 219—223
- [6] Michel C, Alderman D J. Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality. Paris: Office International Des Epizooties, 1992, 254—259
- [7] Hedges R W et al. Resistance plasmids of Aeromonads. *J. Gen. Microbiol.*, 1985, **131**: 2091—2095
- [8] Aoki T et al. Detection of R factors in naturally occurring *V. anguillarum* strains. *Antimicrob. Agents chemother.*, 1974, **6**: 534—538
- [9] Aoki T et al. Multiple drug resistant plasmids from *E. tarda* in eel culture ponds. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 1987, **53**: 1821—1825
- [10] Aoki T et al. New tetracycline resistance determinant on R plasmids from *Vibrio anguillarum*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1987, **31**: 1446—1449

- [11] Toranzo A E et al. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infection and Immunity*, 1983, **39**: 184—192
- [12] 薛广波, 张子福. 痢疾杆菌中 R 因子的检出及其消除研究. *解放军医学杂志*, 1981, **6**(3): 145—149
- [13] Kim E et al. Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 1993, **37**: 103—109
- [14] Takashima N et al. Epidemiological surveillance of drug-resistant strains of *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol.*, 1985, **20**: 209—217
- [15] Aoki T et al. Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium, *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.*, 1985, **8**: 345—350

DETECTION AND PROPERTIES OF TRANSFERABLE R⁺ PLASMID IN FISH-PATHOGENIC BACTERIA

Li Aihua

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Fifteen strains of fish pathogens were tested for their sensitivity to 17 different antibacterial agents and the detected drug resistant strains were investigated to determine if they possessed R plasmids. These pathogens included *A. hydrophila*, *Vibrio*, *E. tarda*, *Yersinia* and *Pseudomonas*. Most of them were resistant to β -Lactams and erythromycin. All of tested strains were sensitive to tobramycin. The transferable R plasmid pWH9601 was detected from a strain of *A. hydrophila* CJ26. The detected R plasmid showed resistance to tetracycline and sulfonamides. Resistance to tetracycline conferred by pWH9601 was inducible in *E. coli* K-12 after exposure to 1.0 μ g of tetracycline per ml. This plasmid can transfer to *E. coli* K-12 RC85 from *A. hydrophila* CJ26 within 0.25h at 37°C by bacterial mating. This transfer can occur at 12°C.

Key words R plasmid, Drug resistance, Fish pathogen