

## 大肠杆菌 R 质粒接合转移到霍乱弧菌

王荣福\* 王曾遂\*\* 戴炯敏\*\*\*

周明娥\*\* 林玉尊\*\*

个别类型的大肠杆菌能同霍乱弧菌接合配对,使不耐药的霍乱弧菌同时获得对链霉素、庆大霉素、卡那霉素、土霉素、四环素、红霉素、合霉素、氯霉素、金霉素、新霉素等多种抗生素的耐药性。研究了影响接合率的各种因素。讨论了大肠杆菌肠毒素基因有可能同 R 质粒一起通过接合转移给霍乱弧菌,从而使无毒霍乱弧菌转变成有毒霍乱弧菌。

霍乱弧菌和产肠毒素型大肠杆菌都能引起人类严重腹泻,二者的临床表现和发病机制也很相似<sup>[1,2]</sup>,因此研究二者之间的关系很有必要,特别是有毒霍乱弧菌的消长及其耐药性产生同大肠杆菌的关系更受重视。

世界上大多数国家和地区,从霍乱病人体内分离的霍乱弧菌对大多数抗生素都是高度敏感的。但是,坦桑尼亚和孟加拉国等地已发现耐药性霍乱弧菌<sup>[3]</sup>,这种耐药性菌的出现给霍乱病的临床学和流行病学带来了新问题,因此必须寻找原因,加以防止。

接合配对是革兰氏阴性细菌之间常见的杂交方式,尤其是肠道细菌之间更为常见<sup>[4]</sup>。关于接合作用机理的报道较多<sup>[4,5]</sup>,这种接合过程不仅可以传播耐药性,而且可使受体菌获得产生肠毒素的能力及其它特性<sup>[6,7]</sup>,本文报告霍乱弧菌与大肠杆菌接合杂交的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌种

1. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*): 大多由腹泻病人粪标本分离,少数为实验室保存菌种,选取对链霉素耐药者即与霍乱弧菌进行接合试验。

2. 霍乱弧菌: (*Vibrio cholerae*): 系实验室保

藏菌种。5 株菌种都是 El Tor 型,均对链霉素等药物敏感(详见表 2)。

### (二) 培养基

1. 增菌及接合用培养基: 肉汤培养基成份(%) : 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.5, pH 7.6。

2. 选择培养基: 即含链霉素(100r/ml) 的双洗培养基,成份是(%) : 蛋白胨 2, 酵母膏 0.2, 无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1, NaCl 0.5, 洗衣粉 0.25, 琼脂 2.5。再添加: 亚硫酸钾 10 r/ml, 甘露糖 0.2%, 链霉素 100 r/ml。

### (三) 接合配对方法

将霍乱弧菌和大肠杆菌分别接种肉汤培养基, 37℃ 培养 12 小时, 两菌等量混合, 再静置培养 1.5 小时。取 0.25 ml 涂在链霉素双洗平板上, 37℃ 培养 24 小时, 计数长出的菌落数(全是杂交菌)。另将混合菌液稀释一定倍数取 0.25 ml 涂在无链霉素的双洗培养基平板上, 37℃ 培养 24 小时, 计算长出的菌落数[所有霍乱弧菌(受体菌)的活菌数]。

在链霉素双洗平板上, 霍乱菌因受 100 r/ml 的链霉素抑制而不生长。而供体菌大肠杆菌则因亚硫酸钾和碱性条件不生长, 只有杂交菌种, 即耐药性霍乱弧菌能够生长。在无链霉素的双洗平板上, 大肠杆菌仍因亚硫酸钾和碱性条件而不生

本文于 1981 年 3 月 16 日收到。

\* 原上海第一医学院微生物教研组, 现在上海第一结核病院。

\*\* 上海第一医学院流行病学教研室。

\*\*\* 复旦大学生物系。

长,但所有霍乱弧菌均可生长。

$$\text{接合率} = \frac{\text{杂交菌数}}{\text{受体菌(即霍乱弧菌)菌数}} \times 100\%$$

## 结 果

### (一)不同大肠杆菌与不同霍乱弧菌的接合率

由 25 株耐链霉素的大肠杆菌(其中 5

株由上海华山医院病人粪标本分离, 16 株由上海儿科医院患儿粪标本分离, 4 株是实验室保存菌种) 同 5 株霍乱弧菌进行了接合试验, 结果仅一株大肠杆菌(5 号大肠杆菌, 由华山医院成年腹泻病人的粪标本分离)能同霍乱菌接合, 但所有 5 株霍乱弧菌都能与此大肠菌接合, 不过其接合率不同(表 1)

表 1 大肠杆菌与不同霍乱弧菌的接合率

Table 1 Frequency of the conjugation of *E. coli* 5 with the strains of *V. cholerae*

供体菌 Donor strain	受体菌 Recipient strain ( <i>V. cholerae</i> )	接合率 Frequency of the conjugation
<i>E. coli</i> 5	1078 (稻叶型, 无毒株)* Serotype Inaba, nontoxigenic	$0.42 \times 10^{-6}$
<i>E. coli</i> 5	164 (稻叶型, 有毒株)* Serotype Inaba, toxigenic	$0.22 \times 10^{-6}$
<i>E. coli</i> 5	1459 (稻叶型, 有毒株) Serotype Inaba, toxigenic	$0.25 \times 10^{-6}$
<i>E. coli</i> 5	T (小川型, 有毒株) Serotype Ogawa, toxigenic	$0.4 \times 10^{-7}$
<i>E. coli</i> 5	N (小川型, 无毒株) Serotype Ogawa, nontoxigenic	$0.14 \times 10^{-7}$

\* 指在动物试验中有否毒力。

Toxigenic or nontoxigenic strain of *V. cholerae* is pathogenic or nonpathogenic in animal models.

由表 1 可见, 5 号大肠杆菌与霍乱弧菌的接合率大约是  $10^{-6}$ — $10^{-7}$ 。但稻叶型霍乱弧菌比小川型的接合率略高些, 而有毒株和无毒株均可接合。

试验的 25 株耐药大肠杆菌中, 仅有一株能将耐药因子传递给霍乱弧菌, 这同下述观点相吻合, 即接合的发生必须在受体菌表面带有与供体菌性菌毛相对应的特异性受体的情况下<sup>[4]</sup>。

### (二) 耐药性的获得

利用平板纸片法测定了 5 号大肠杆菌(供体)与各株霍乱弧菌(受体)及其杂交菌株的耐药情况, 结果见表 2。

由表 2 可见, 5 号大肠杆菌(供体菌)

对 10 种抗菌素有耐药性而对痢特灵和呋喃妥因敏感。而 5 株霍乱弧菌(受体菌)则对该 10 种抗菌素均无耐药性, 同时对痢特灵和呋喃妥因也敏感。二者的杂交后代(即与 5 号大肠杆菌接合后的霍乱弧菌)则获得了供体菌的所有耐药性——对庆大霉素、氯霉素、新霉素、合霉素、四环素、卡那霉素、红霉素、链霉素、土霉素、金霉素均产生耐药性。但对痢特灵和呋喃妥因则仍敏感。这一结果说明这 10 种抗菌素的耐药性可能是同一质粒编码的, 接合配对后, 这个质粒进入霍乱弧菌, 从而使后者获得了上述耐药能力。

利用试管稀释法测定了供体菌、受体

表 2 大肠杆菌、霍乱弧菌及其杂交株的耐药性

Table 2 Drug-resistance of *E. coli* 5, *V. cholerae* and their transconjugant strains

菌株 strains	药 物 Drug	庆大霉素 Gm	氯霉素 Cm	新霉素 Nm	合霉素 St	四环素 Tc	红霉素 Em	链霉素 Sm	土霉素 Tr	金霉素 Au	卡那霉素 Km	痢特灵 Fz	呋喃妥因 Ft
大肠杆菌 5 号 <i>E. coli</i> 5		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	1078	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	164	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1459	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
杂交株 The transconjugant strains	5-1078	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
	5-N	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
	5-T	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
	5-164	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
	5-1459	++++	++	++++	++++	++	++	++++	++++	++++	++++	—	—

++++: 无抑菌环,示高度耐药。Inhibition zone=0, highly resistance.

++: 抑菌环较小,示中度耐药。Intermediate resistance.

—: 抑菌环直径大于 16 mm, 高度敏感。Inhibition zone>16mm, highly sensitive.

菌及杂交菌株对链霉素的抗菌效价,以便定量地了解杂交后菌株的药物敏感性的变化。结果表明: 供体菌效价为 125r/ml, 受体菌 1078 菌株效价为 2r/ml, T 菌株为 1r/ml, N 菌株为 1r/ml。杂交菌株 5-1078 效价为 125 r/ml, 5-T 与 5-N 菌株效价均

为 250 r/ml。受体菌原来对链霉素高度敏感,但接合后产生的杂交菌株则获得了同供体菌相同或略高的耐药性,这可能是由于同一基因在不同细菌中表达不同所致。

(三)杂交菌株的鉴定和生化特征

用霍乱弧菌小川型和稻叶型单价血清

表 3 杂交菌株及其亲代的生化特点

Table 3 Biochemical reaction of the transconjugant strains and their parents

项 目 Item	菌株 Strains	大肠杆菌 5 号 <i>E. coli</i> 5	1078	5-1078 Generation 1	5-1078 Generation 4	T	5-T
葡萄糖发酵 Glucose		+	+	+	+	+	+
乳糖发酵 Lactose		+	—	—	—	±	±
甘露糖发酵 Mannitol		+	+	+	+	+	+
蔗糖发酵 Sucrose		—	+	+	+	+	+
阿拉伯糖发酵 Arabinose		+	—	—	—	—	—
淀粉液化 Hydrolyzed of starch		—	+	+	+	+	+
霍乱红试验 Cholera-red test		—	+	+	+	+	+
吲哚试验 Indole test		+	+	+	+	+	+
山梨醇发酵 Sorbitol (3h)		+	+	+	+	—	—

+: 产酸或阳性反应。Fermentation or positive reaction.

—: 不发酵或阴性反应。Nonfermentation or negative reaction.

对接合后的杂交菌种进行玻片凝集反应, 发现杂交菌株均与其亲代受体菌株一样, 分别属于霍乱弧菌的小川型 (T, 5-T, N, 5-N) 或稻叶型 (1078, 5-1078, 164, 5-164, 1459, 5-1459), 未发现血清型转变。

革兰氏染色镜检表明杂交菌株都是略有弯曲的革兰氏阴性弧菌。

各菌株的生化试验特点见表 3。

由表 3 可见, 杂交菌的生化反应特征完全与其受体菌相同。杂交后的第一代及传代菌株也未发生遗传特性的分离。

以上结果说明, 供体菌仅向受体菌输

送了耐药基因, 而没有附带供体菌的染色体基因。这与大肠杆菌 HfrC 高频重组系菌株的质粒不同, 后者在接合时, 常把供体菌的染色体基因部分地撕带而输送给受体菌<sup>[8,9]</sup>。

#### (四) 接合率高低的影响因素

1. 接合时间: 将 5 号大肠杆菌与 1078 霍乱弧菌分别接种肉膏汤培养基, 37℃ 培养 12 小时后取等量混合, 再于 37℃ 培养不同时间, 从同一试管中取样测定接合率。结果见表 4。

由表 4 可见, 混合 5 分钟或 15 分钟尚

表 4 不同接合时间的接合率

Table 4 Frequency of conjugation in various period of mating

接合时间(小时) Period of mating (h)	1/12	1/4	1/2	1	1.5	3	6	9	2	48
霍乱菌数 Number of <i>V. cholerae</i>	5.9×10 <sup>8</sup>									
杂交菌数 Number of transconjugant	0	0	4	168	336	1,500	6,780	36,500	69,700	56,000
接合率(×10 <sup>-8</sup> ) Frequency of the conjugation	0	0	0.68	28	57	254	1,150	6,190	11,800	9,500

未产生杂交菌种, 混合半小时开始出现杂交菌种, 此后随混合时间延长, 接合率不断提高, 24 小时左右接合率达到高峰, 继续延长接合时间, 接合率不再提高。

2. 预培养时间对接合率的影响: 将 5

号大肠菌与霍乱弧菌 1078 分别接种于牛肉浸出液肉汤培养基中, 37℃ 培养。于不同时间分别从同一试管中取样, 等量混合, 37℃ 再培养(接合) 1.5 小时, 测定其接合率, 结果见表 5。

表 5 不同菌龄细菌的接合率

Table 5 Frequency of conjugation in various ages of bacteria

菌龄(小时) Ages of bacteria (h)	6	12	24	48	72
霍乱菌数(×10 <sup>8</sup> ) Number of <i>V. cholerae</i>	2.76	3.1	10	5.5	0.48
杂交菌数 Number of transconjugant	120	7,800	117,000	360,000	33,800
接合率(×10 <sup>-8</sup> ) Frequency of conjugation	0.43	25	117	650	700

由表 5 可见, 菌龄越老, 接合率越高, 其原因看来主要是由于杂交菌比亲本菌抵

抗力强, 不易死亡, 而亲本(受体菌)大量死亡造成接合率相对提高。24—48 小时期

间,受体菌(霍乱菌)数量减少,而杂交菌反而增加一倍以上,说明杂交菌可能有一定程度的繁殖。

3. 两种细菌不同比例混合对接合率的影响: 将 5 号大肠菌和霍乱弧菌 1078 分

别接种牛肉浸出液肉汤培养基, 37℃ 培养 12 小时, 再将二种细菌按不同菌数比例混合, 37℃ 接合 1.5 小时再测定接合率, 结果见表 6。

由表 6 可见: 以供体菌计算接合率,

表 6 供体菌和受体菌按不同菌数比例混合的接合率

Table 6 Frequency of conjugation in various bacterial number of the donor and recipient used in the mating experiments

大肠杆菌菌数 ( $\times 10^7$ ) Number of <i>E. coli</i>		$172 \times \frac{1}{4}$	172	172	172	172
霍乱弧菌菌数 ( $\times 10^7$ ) Number of <i>V. cholerae</i>		173	$173 \times \frac{1}{5}$	$173 \times \frac{1}{25}$	$173 \times \frac{1}{125}$	$173 \times \frac{1}{625}$
杂交菌数 Number of transconjugant		12900	10400	7200	2250	1130
接合率 Frequency of conjugation	以供体菌计 According to donor strain	$3 \times 10^{-3}$	$0.6 \times 10^{-3}$	$0.4 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-6}$	$0.66 \times 10^{-6}$
	以受体菌计 According to recipient strain	$0.7 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-4}$	$4.1 \times 10^{-4}$

随受体菌数的减少接合率逐渐降低。这是因为接受供体菌性菌毛粘附的机会少了。以受体菌计算接合率, 则随着供体菌数的相对增多, 接合率也逐渐升高。这是因为对每一个受体菌来说, 接受性菌毛粘附的机会多了。由此说明, 接合率高低既受供体菌数量的影响也受受体菌数量的影响。

4. 培养基营养条件对接合率的影响: 选用了四种培养基(肉膏汤、牛肉浸液肉汤、10%血清肉浸液、1%葡萄糖肉浸液), 分别接种大肠杆菌 5 号和霍乱弧菌 1078 菌株。菌龄均为 12 小时, 接合时间为 1.5 小时。肉膏汤、牛肉浸液肉汤、10% 血清肉浸液、1% 葡萄糖肉浸液四种培养条件下的接合率分别为:  $1.86 \times 10^{-6}$ 、 $3.28 \times 10^{-5}$ 、 $6.2 \times 10^{-4}$  和 0。其中以 10% 血清肉浸液的接合率最高。这可能是由于在营养条件好的情况下, 性菌毛发育较好, 而质粒转移的频率主要取决于性菌毛形成的效率<sup>[9]</sup>。葡萄糖肉汤培养基不适于接合, 因为大肠杆菌发酵葡萄糖产酸使培养基 pH 降低到

4.5 以下, 在这种条件下, 霍乱弧菌大量死亡, 这里的霍乱弧菌活菌计数仅  $3 \times 10^4/\text{ml}$ , 比其它培养基少 10 万倍。

5. 半固体培养条件对接合率的影响: 据报道, 由于霍乱弧菌运动十分活泼, 因此在进行接合时容易脱离开来<sup>[10]</sup>。为此, 我们在二种菌混合培养时, 加入不同量的琼脂, 以求减弱霍乱弧菌的活泼运动。测定接合率的结果是: 不含琼脂时为  $0.27 \times 10^{-6}$ , 含 0.15% 琼脂时为  $0.45 \times 10^{-6}$ , 含 0.3% 琼脂时为  $0.65 \times 10^{-6}$ 。结果表明, 半固体状态下使接合率略有提高。

## 讨 论

上述结果说明, 个别种类的大肠杆菌确能与多种霍乱弧菌接合杂交, 并使霍乱弧菌获得多重耐药性。从其接合条件可以看到: 第一, 由于能够与霍乱弧菌接合的大肠杆菌菌株并不多, 且接合率不太高, 因此产生杂交菌种(如耐药性霍乱弧菌)的机会相对说来不太多。第二, 虽然在体外,

二种细菌发生接合的机会不多,但在肠道内,只要大肠杆菌的特定株存在(耐药性大肠杆菌大多带有可转移的质粒),而霍乱弧菌又有一定的数量,则可能发生接合。尤其是在霍乱患者的肠道内,大肠杆菌与霍乱弧菌同时存在,二者接合的机会并不少。

另一方面,由于本工作证明了大肠杆菌质粒可以通过接合而传递给霍乱弧菌,我们就不能不怀疑:产毒素型大肠杆菌与无毒霍乱弧菌的接合可否产生有毒霍乱弧菌?

认为可能的根据是:大肠杆菌肠毒素的作用机制、免疫原性都与霍乱菌肠毒素十分相似,二者所致疾病也很相似。更重要的是,编码大肠杆菌肠毒素的质粒大多可以通过接合转移;原来不产毒素的大肠杆菌只要得到了这种质粒就获得了产毒素的能力<sup>[1,7,10-12]</sup>。有人特别指出:肠毒素基因和耐药基因常在同一个质粒上,有 35% 的大肠杆菌菌株在接合转移耐药性的同时,也转移了产肠毒素的能力<sup>[7]</sup>。

持否定态度的根据是:第一,至今未见到这种报道。第二,霍乱弧菌肠毒素基因定位在染色体上,而大肠杆菌肠毒素基因在质粒上。但是,由于质粒与染色体的

关系十分密切,而且已有报道霍乱弧菌可因质粒诱导而失去毒力<sup>[13]</sup>。由于霍乱病的发生和流行主要取决于有毒霍乱弧菌的消长,因此有必要对此问题进行深入地研究。

## 参 考 文 献

- [1] 大橋誠, 著 鎌寺浩: 日本细菌学雑誌, 32 (3): 455, 1977.
- [2] Barua, D. and W. Burrows: *Cholera* 30, 47, Phila Saunders 1974.
- [3] United Republic of Tanzania: *Wkly Epidemiol Rec*, 54 (43): 333, 1979.
- [4] Jawatz, E. et al.: *Review of medical Microbiology* 13th ed 46, 48, Los Altos Lange 1978.
- [5] 王荣福: 国外医学参考资料, 医用微生物学分册, 1: 18, 1978.
- [6] 王荣福、曹蔚文: 国外医学、微生物学分册, 4(3): 109, 1981.
- [7] Echeverria, P. et al., *Lancet*, 2(8090): 589, 1978.
- [8] 杨正时等: 微生物学报, 19(4): 442, 1979.
- [9] Singleton, P. and D. Sainsbury: *Dictionary of Microbiology* 103 Chichester Wiley, 1978.
- [10] Smith, H. W. and S. Halls: *J. Gen. Microbiol*, 52: 319, 1968.
- [11] Pierce, N. F. and C. K. Wallace: *Gastroenterology* 63: 439, 1972.
- [12] Gyles, C. L. et al.: *J. Infect Dis.* 130: 40, 1974.
- [13] Sinha, V. B. and B. S. Srivastava: *Nature*, 276(14): 709, 1978.

## STUDY OF TRANSFERRED R-PLASMID OF *ESCHERICHIA COLI* TO *VIBRIO CHOLERA*E BY CONJUGATION

Wang Rongfu\* Wang Zengsui\*\* Dai Xianmin\*\*\* Zhou Ming\*\* Lin Yuzun\*\*

In this article we report that *E. coli* strain had ability to mate with *Vibrio cholerae* (El Tor) strains and it had been demonstrated that antibiotic non-resistance *V. cholerae* strains had been acquired multiple antibiotic resistance. These antibiotics are: Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Terramycin, Tetracycline, Erythromycin, Synptomycin, Chloramphenicol, Aureomycin and

Neomycin etc.

In this article, we also record the details of some factors which influence the frequency of conjugation. The possibility that genes coding for enterotoxin in *E. coli* are transferred together with R-plasmid to *V. cholerae* and that non-toxigenic *V. cholerae* strains are transferred to toxigenic *V. cholerae* strains was discussed.

\* The Bacteria Laboratory of Shanghai First Tuberculosis Hospital, Shanghai.

\*\* Department of Epidemiology, Shanghai First Medical College, Shanghai.

\*\*\* Department of Biology, Fudan University, Shanghai.