



抗生素对溶藻弧菌SXT/R391元件转移频率的影响

何香燕^{1,2}, 罗鹏^{1*}, 高沿^{1,2}, 胡超群¹, 韦露^{1,2}, 刘秋婷^{1,2}

¹ 中国科学院南海海洋研究所, 中科院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301

² 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】研究萘啶酸、诺氟沙星、卡那霉素3种抗生素对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) SXT/R391元件ICEValA056-1转移频率的影响。【方法】利用PCR检测溶藻弧菌A056中ICEValA056-1的自我剪切、转移潜力。通过溶藻弧菌A056与大肠杆菌菌株VB111的接合实验, 研究溶藻弧菌分别在含不同浓度萘啶酸、诺氟沙星、卡那霉素的LB培养基中培养15 min或30 min后, ICEValA056-1转移频率的变化规律。【结果】溶藻弧菌A056细胞中有环状形式的ICEValA056-1分子存在, 具有水平转移潜力; 溶藻弧菌A056在含40 μg/mL萘啶酸的LB中培养30 min后, ICEValA056-1转移频率是对照组的19.59倍; 在含50 μg/mL诺氟沙星的LB中培养15 min后, ICEValA056-1转移频率是对照组的31.25倍; 在含不同浓度卡那霉素的LB中培养30 min后, ICEValA056-1转移频率与对照组没有显著差别。【结论】部分抗生素的使用可以明显促进溶藻弧菌ICEValA056-1向大肠杆菌的转移, 因此海洋环境中抗生素的滥用及随意排放很可能加剧ICEs (integrating conjugative elements)从溶藻弧菌到其他细菌的传播。

关键词: 溶藻弧菌, SXT/R391元件, 转移频率, 抗生素

SXT/R391元件是一类能携带多种适应性功能基因及抗性基因, 通过自我剪切、转移、整合而转移的一类整合性接合元件(ICEs), 是ICEs中多样性最为丰富、成员最多的1个家族^[1-3]。SXT/R391元件除了可携带可变区的抗性基因转移之外, 还能促进基因岛(可能携带一些毒力基因、抗性基因)及毒性质粒的转移^[3-4]。此外, 绝大部分SXT/R391元件携带限制修饰系统, 能保护宿主免于噬

菌体的入侵, 增强宿主除抗生素、重金属抗性之外的适应性^[5]。SXT/R391元件具有较高的转移频率且能在亲缘关系遥远的物种间转移^[6]。自SXT/R391元件在O139霍乱弧菌中首次发现以来, 目前已经在发光杆菌、施万氏菌、变形杆菌以及弧菌属等多种不同细菌种属中发现了SXT/R391元件的存在^[6]。

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)属于弧菌科弧

基金项目: 国家自然科学基金(31370149); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-EW-G-12B)

*通信作者。Tel: +86-20-89023218; E-mail: luopeng@scsio.ac.cn

收稿日期: 2015-06-30; 修回日期: 2015-09-15; 网络出版日期: 2015-10-21

菌属,革兰氏阴性短杆菌,广泛分布于世界各地海水及河口处,是海水弧菌中最为常见的种类^[7-8],也是人和动物共患的条件致病菌^[9-10]。2012年,我们在华南沿海的溶藻弧菌中发现了SXT/R391元件,在检测的192株溶藻弧菌中,SXT/R391元件出现率高达8.9%^[11]。其它学者也在溶藻弧菌中发现了与SXT/R391相关的ICE^[12-13]。由于溶藻弧菌分布的广泛性和常见性,SXT/R391元件在溶藻弧菌中的出现很可能会加速ICE的扩散,对人类的健康及海洋环境的安全构成潜在的威胁。SXT/R391元件高频率出现于中国沿海区域^[11,13],不能不引起我们的重视,并促使我们去探索其高频率出现的原因。

2004年,Beaber等^[14]发现,丝裂霉素、环丙沙星可以引起调节SXT/R391元件剪切和转移的主要基因*setCD*表达的显著增加,从而促进ICE转移。因此提示我们抗生素造成的选择压力很可能是SXT/R391元件加剧传播的原因之一。除了丝裂霉素、环丙沙星之外,其它抗生素对SXT/R391元件转移频率的影响均没有具体的统计报道。此外,现有的SXT/R391元件转移频率研究局限于大肠杆菌、霍乱弧菌临床株之间,对其他弧菌SXT/R391元件的转移频率研究非常少。

2015年,我们获得了1株溶藻弧菌A056的ICE*ValA056-1*的全序列(GenBank登录号:KR231688),并明确了ICE*ValA056-1*在基因组插入位点为*prfC*基因。本研究首先采用PCR方法确认了ICE*ValA056-1*剪切、转移的潜力,然后研究ICE*ValA056-1*在萘啶酸(Nx)、诺氟沙星(Nf)、卡那霉素(Kn)刺激下,其转移频率的变化。期望通过本研究了解更多影响SXT/R391元件转移的因素,并引起人们对抗生素滥用和随意排放的重视。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

溶藻弧菌A056由本课题组于2003年从湛江海水中分离并保存,其自身具有氨基霉素(Ap)抗

性,其ICE*ValA056-1*具有磺胺甲恶唑(Su)、链霉素(Sm)抗性;大肠杆菌VB111由加拿大Sherbrooke大学Vicent Burrus教授赠送,具有萘啶酸(Nx)抗性;所有的细菌都在Luria Broth (LB)培养基(Amresco)培养,培养温度为37 °C。

1.2 主要试剂

Nx为美国BBI公司产品,实验使用浓度4、20和40 µg/mL, LB固体平板中使用40 µg/mL; Nf购自美国Amresco公司,使用浓度5、20和50 µg/mL; Kn为生工生物工程(上海)股份有限公司进口分装产品,使用浓度10、20和30 µg/mL; Ap为生工生物工程(上海)股份有限公司进口分装产品,使用浓度30 µg/mL; Su购自美国Sigma公司,使用浓度200 µg/mL; DNA提取试剂盒购自美国Omega公司。

1.3 溶藻弧菌A056 ICE*ValA056-1*自我剪切、环化能力检测

根据ICE整合和剪切的特征(图1),在SXT/R391元件两端正向重复序列attL、attR位点上下游设计4条引物,引物位点见图1,引物依次为attL-A: 5'-CAGTTTGCTAGCACAGCGATA-3'; attL-B: 5'-ACACTCGCAACAATGACACATC-3'; attR-C: 5'-CTACAACCTGAGCATTGGTGCA-3'; attR-D: 5'-TGCATTACAGAAGTGGTTACC-3'。attL-A/attL-B用于检测ICE*ValA056-1*在基因组插入位点的左侧,目的条带552 bp; attR-C/attR-D用于检测ICE*ValA056-1*在基因组插入位点的右侧,目的条带421 bp; attL-B/attR-C用于检测剪切后环化的ICE*ValA056-1*,目的条带642 bp; attL-A/attR-D用于检测ICE*ValA056-1*从基因组切除后,基因组暂时存在的完整*prfC*位点,目的条带331 bp。由图可见,当细菌只存在整合形式的ICE时,只有引物对attL-A/attL-B、attR-C/attR-D能扩出预期条带;当细菌同时存在剪切和整合状态的ICE*ValA056-1*时,以细菌DNA为模板能扩出4条目的条带。

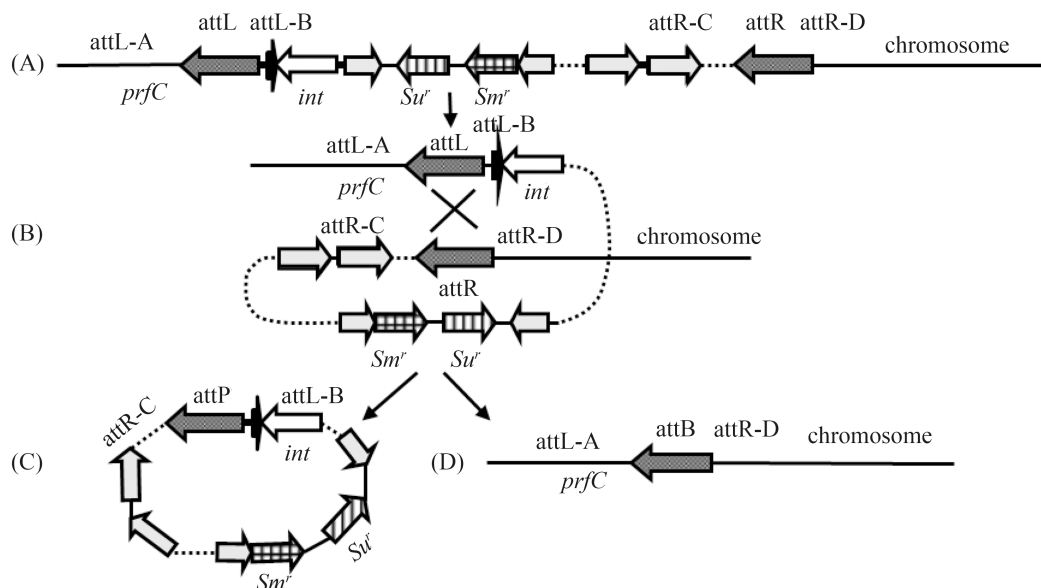


图 1. ICEValA056-1整合于染色体的线性形式和剪切后的环状形式示意图

Figure 1. The schematic view of the linear and circular forms of ICEValA056-1. A: the linear form of ICEValA056-1; B: the recombination of ICEValA056-1; C: the circular form of ICEValA056-1; D: the chromosome of *Vibrio alginolyticus* A056 without ICEValA056-1.

DNA提取试剂盒(Omega)提取未经抗生素处理的溶藻弧菌A056基因组DNA, 提取方法按试剂盒说明。

PCR条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 25 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 7 min。

1.4 接合前菌株培养

分别接种供体菌溶藻弧菌A056、受体菌大肠杆菌VB111于4 mL LB液体培养基中, 37 °C过夜培养16 h。取过夜培养的供体菌种子液1 mL加入4 mL新鲜的液体LB继续培养1 h, 共设3个重复, 受体菌不做任何处理继续培养。取1 mL新鲜培养的供体菌加入相应的抗生素处理15或30 min (实验组), 对照组菌液不做任何处理与实验组培养相同时间, 对照组与实验组的各处理均设3个重复。

1.5 细菌接合实验

实验组和对照组各取100 μL供体菌与100 μL受体菌混合于1.5 mL离心管, 6000×g离心2 min, 去上清, 加入1 mL LB液体培养基旋涡重悬细胞, 6000×g离心2 min, 去尽上清。重复洗涤

1次。每管加入10 μL LB液体培养基充分重悬, 取10 μL, 点此悬液滴到LB平板, 菌悬液滴于平板后直径不超过1 cm, 超净台中静置至表面水分挥发。于37 °C培养箱倒置培养6 h。每个平板用LB液体培养基1 mL, 充分吹悬菌斑, 菌悬液转入到离心管中, 旋涡混匀。用LB液体培养基分别旋涡梯度稀释菌悬液至 10^{-6} 。对照组、实验组的 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释菌液涂布LB板(Su^+ , Nx^+), 用于计数接合子数量(ICEValA056-1具有 Su^r 抗性); 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释菌液涂布LB板(Ap^+), 用于计数供体菌; 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释菌液涂布LB板(Nx^+), 用于计数受体菌。计数平板均37 °C倒置培养过夜。

1.6 ICEValA056-1转移频率的计算

以平板长的单菌落数30–500个为宜, 用计数器计数合适浓度平板的单菌落数同时用红笔标记计数过的单菌落。以受体菌大肠杆菌VB111形成接合子个数与供体菌数量的比值作为转移频率^[14]。同时进行双尾t检验^[15], 检测处理组与对照组之间的差异显著性。

2 结果和分析

2.1 溶藻弧菌A056 ICEValA056-1自我剪切、环化能力检测

以未经抗生素处理的溶藻弧菌A056 DNA为模板, 以attL-A/attL-B、attR-C/attR-D、attL-A/attR-D、attL-B/attR-C为引物对, PCR分别扩增出552、421、331、642 bp的条带(图2), 表明ICEValA056-1在溶藻弧菌A056细胞内能以两种形式存在: 既能以线性形式整合在细菌染色体中, 又能自我剪切成环状分子存在于细胞内。环状形式是SXT/R391元件转移过程中的中间形式, 因此从分子角度证明了ICEValA056-1具有可转移的潜力。

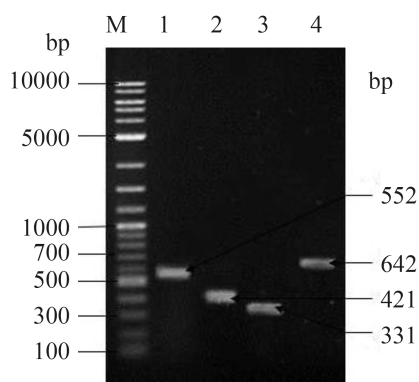


图2. ICEValA056-1自我剪切环化能力检测

Figure 2. Detection of the excised and circular ICEValA056-1. M: DL10000 DNA marker; lane 1, lane 2, lane 3 and lane 4 represent the results of PCR with primer pairs, attL-A/attL-B, attR-C/attR-D, attL-A/attR-D and attL-B/attR-C, respectively.

2.2 Nx对ICEValA056-1转移频率的影响

不同浓度的Nx处理溶藻弧菌A056后, ICEValA056-1转移频率如图3所示。由图可见, 溶藻弧菌A056在含4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nx的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率(3.83×10^{-4})是对照组(1.04×10^{-4})的3.69倍($P=0.026$)。在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nx的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率

(1.22×10^{-3})是对照组(1.04×10^{-4})的11.72倍($P=0.019$)。在40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nx的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率(2.03×10^{-3})是对照组(1.04×10^{-4})的19.59倍($P=0.014$)。结果表明随着Nx浓度的增加, ICEValA056-1转移频率也较大幅度增加。结合双尾t检验, P值均小于0.05, 说明Nx刺激能显著增加溶藻弧菌ICEValA056-1的转移频率。

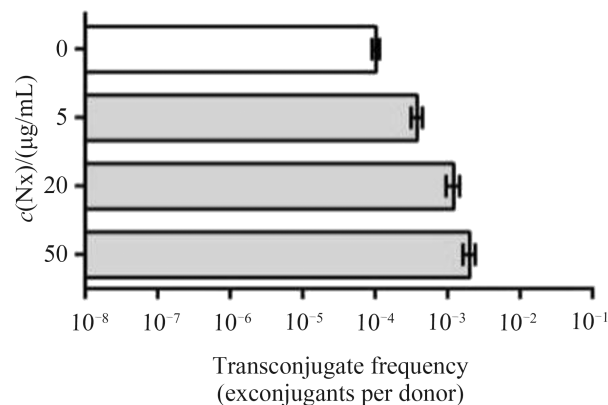


图3. Nx对ICEValA056-1转移频率的影响

Figure 3. The effect of Nx on the transfer frequency of ICEValA056-1.

2.3 Nf对ICEValA056-1转移频率的影响

不同浓度Nf处理溶藻弧菌A056后, ICEValA056-1转移频率如图4所示。由图可见, 溶藻弧菌A056在含5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nf的LB中培养15 min, ICEValA056-1转移频率(6.09×10^{-4})是对照组(7.11×10^{-5})的8.57倍($P=0.01$)。在含20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nf的LB中培养15 min, ICEValA056-1转移频率(8.34×10^{-4})是对照组(7.11×10^{-5})的11.74倍($P=0.00$)。在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nf的LB中培养15 min, ICEValA056-1转移频率(2.22×10^{-3})是对照组(7.11×10^{-5})的31.25倍($P=0.016$)。结果表明, 随着Nf浓度的增加, ICEValA056-1转移频率也显著增加。结合双尾t检验, P值均小于0.05, 说明Nf能显著增加ICEValA056-1的转移频率。溶藻弧菌

A056在含50 $\mu\text{g/mL}$ Nf的LB中培养仅15 min, ICEValA056-1转移频率比对照增加了30.25倍, 说明ICEValA056-1对Nf的刺激很敏感。

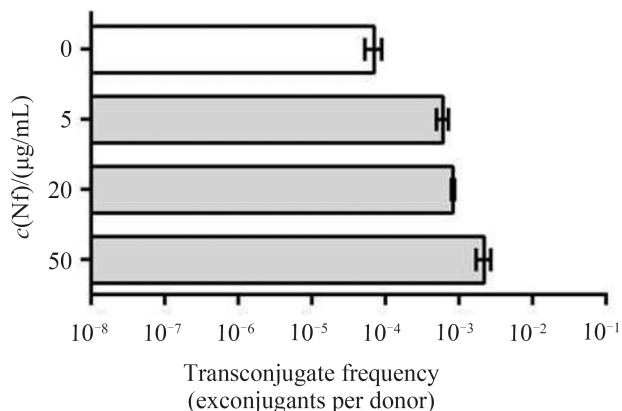


图 4. Nf对ICEValA056-1转移频率的影响

Figure 4. The effect of Nf on the transfer frequency of ICEValA056-1.

2.4 Kn对ICEValA056-1转移频率的影响

不同浓度Kn处理溶藻弧菌A056后, ICEValA056-1转移频率如图5所示。由图可见, 溶藻弧菌A056在含10 $\mu\text{g/mL}$ Kn的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率(5.43×10^{-5})是对照组(7.91×10^{-5})的0.69倍($P=0.345$)。在含20 $\mu\text{g/mL}$ Kn的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率(5.10×10^{-5})是对照组(7.91×10^{-5})的0.64倍($P=0.077$)。在含30 $\mu\text{g/mL}$ Kn的LB中培养30 min, ICEValA056-1转移频率(4.41×10^{-5})是对照组(7.91×10^{-5})的0.56倍($P=0.035$)。结果表明: 随着Kn浓度的增加, ICEValA056-1转移频率没有显著变化。

3 讨论

Beaber等^[14]以大肠杆菌、霍乱弧菌为供体菌, 发现丝裂霉素、环丙沙星能引起SOS反应, 促进SXT/R391元件的转移, 而其它抗生素对SXT/R391元件转移的影响还未有明确数据报道。

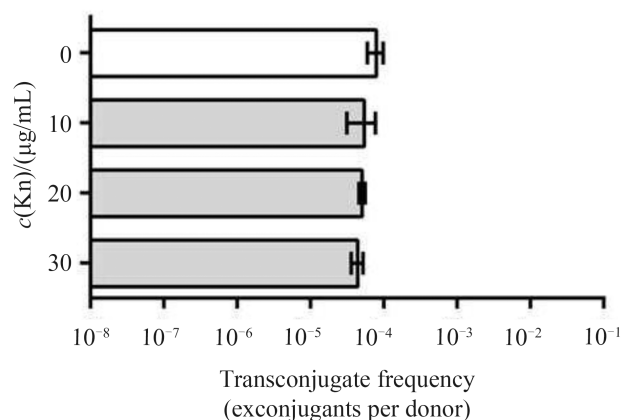


图 5. Kn对ICEValA056-1转移频率的影响

Figure 5. The effect of Kn on the transfer frequency of ICEValA056-1.

我们直接以溶藻弧菌为供体菌, 研究ICEValA056-1在不同浓度抗生素作用下转移情况, 不仅丰富了抗生素对ICE转移影响的知识, 且更接近于海洋环境中SXT/R391元件转移的真实情况。

本文研究了Nx、Nf、Kn 3种抗生素对溶藻弧菌A056中ICEValA056-1转移频率的影响, 发现Nx、Nf 2种抗生素能显著增加ICEValA056-1转移频率, 并且转移频率随着抗生素浓度增加而增加, 而Kn对ICEValA056-1转移影响总体来看并不明显, ICEValA056-1转移频率的略微降低, 可能是Kn对细菌的生理状态造成了轻微的影响, 但与对照相比几乎可以忽略不计。外界因素造成细菌染色体的破坏可引起细菌的SOS反应^[14,16], SOS反应中*recA*表达量增加并发挥清除SXT/R391转移调控阻遏蛋白SetR的辅酶活性, 细胞内SetR量的减少, 能有效降低其对ICE主要激活蛋白SetCD的抑制作用, 从而促进*int*、*xis*等基因的表达, 引起转移的显著增加^[17-19]。Nx、Nf均通过抑制细菌DNA合成而抑菌^[20-21], 而Kn通过阻断细菌蛋白质的合成抑菌^[22]。以上分析表明Nx、Nf与Kn处理对ICEValA056-1转移频率的影响的差异很可能与二者不同的抑菌机制有关, 对细菌DNA造成直接影响的抗生素最有可能引起ICE转移频率的显著增加。

引起细菌SOS反应的因素,如:环丙沙星、丝裂霉素C,可以显著促进ICE元件转移^[14]。然而并非所有的抗生素均能引起细菌SOS反应,已有研究表明喹诺酮类、 β 内酰胺类、甲氧苄啶嘧啶抗生素能在大肠杆菌引起SOS反应^[23-24],而氨基糖苷类、氯霉素、利福平、四环素等抗生素则不能引起大肠杆菌SOS反应^[24-25]。抗生素能否引起细菌SOS反应还具有种属差异,Baharoglu等^[24]发现不引起大肠杆菌SOS反应的氨基糖苷类、氯霉素、利福平、四环素等抗生素却能引起霍乱弧菌的SOS反应,因此即使同一抗生素对不同种属细菌的SXT/R391元件转移影响也可能不一样。本文中,不同浓度的同一种抗生素处理溶藻弧菌,ICEValA056-1的转移频率也表现出差异。这些研究充分表明了引起细菌SOS反应以及参与SOS反应的调控基因的复杂性。

本文的研究仅使用了3种抗生素,其中N_x和N_f可显著增加ICEValA056-1的转移频率。目前临床及兽医使用的抗生素种类多样^[26-28],其中不乏可刺激SXT/R391元件转移的抗生素种类。中国是抗生素生产和消费第一大国,抗生素药物滥用现象较为严重^[28];国家对于生产企业的废水排放监控也主要局限于对人类健康和海洋表观环境造成重要影响的类别上,抗生素生产企业污水排放并未引起社会关注^[29-30];此外水产养殖中抗生素的使用也十分普遍^[31]。这些因素均对环境细菌造成了极大的选择压力,很可能造成环境株ICE转移频率显著增加。此外,鉴于溶藻弧菌分布的广泛性和常见性以及海洋水流的流动特征,ICE在溶藻弧菌中的高频率出现极有可能加速ICE的传播并扩大分布范围,因此需要引起我们的重视。

参考文献

- [1] Bi DX, Xu Z, Harrison EM, Tai C, Wei YQ, He XY, Jia SR, Deng ZX, Rajakumar K, Ou HY. ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D621–D626.
- [2] Garriss G, Poulin-Laprade D, Burrus V. DNA-damaging agents induce the RecA-independent homologous recombination functions of integrating conjugative elements of the SXT/R391 family. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(9): 1991–2003.
- [3] Daccord A, Ceccarelli D, Burrus V. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(3): 576–588.
- [4] Osorio CR, Marrero J, Wozniak RAF, Lemos ML, Burrus V, Waldor MK. Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(9): 3353–3361.
- [5] Balado M, Lemos ML, Osorio CR. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction-modification systems that confer resistance to bacteriophages. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(2): 457–467.
- [6] Luo P, He XY, Hu CQ. Bacterial SXT/R391 family from integrating conjugative elements – a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(5): 471–479. (in Chinese)
罗鹏, 何香燕, 胡超群. 细菌整合性接合元件SXT/R391研究进展. *微生物学报*, 2014, 54(5): 471–479.
- [7] Luo P, Hu CQ. Analysis of *gyrB* sequences of *Vibrio alginolyticus* and *gyrB*-targeted rapid PCR identification of the bacterium from environmental isolates. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 82(3): 209–216.
- [8] Jiang X, Ren CH, Hu CQ, Luo P, Chen C, Feng JB. On dynamic change of *Vibrio* species in the Daya Bay using molecular identification method. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(4): 154–159. (in Chinese)
江晓, 任春华, 胡超群, 罗鹏, 陈偿, 冯敬宾. 分子鉴定方法研究大亚湾水体弧菌种类变化. *热带海洋学报*, 2010, 29(4): 154–159.
- [9] Chen Q, Yan QP, Ma S. Progress on pathogenicity research of *Vibrio alginolyticus*. *Marine Science*, 2006, 30(8): 83–89. (in Chinese)
陈强, 鄢庆枇, 马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展. *海洋科学*, 2006, 30(8): 83–89.
- [10] Feng HR, You JR, Liu YT, Li S. Research of one abrupt food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus*. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2003, 15(4): 331–334. (in Chinese)
封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 李珊. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(4): 331–334.

- [11] Luo P, Jiang HY, Wang YH, Su T, Hu CQ, Ren CH, Jiang X. Prevalence of mobile genetic elements and transposase genes in *Vibrio alginolyticus* from the southern coastal region of China and their role in horizontal gene transfer. *International Microbiology*, 2012, 15(4): 201–210.
- [12] Rodríguez-Blanco A, Lemos ML, Osorio CR. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2619–2626.
- [13] Song YZ, Yu P, Li BL, Pan YJ, Zhang XJ, Cong J, Zhao YY, Wang H, Chen LM. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 214.
- [14] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 2004, 427(6969): 72–74.
- [15] Carraro N, Matteau D, Luo P, Rodrigue S, Burrus V. The master activator of IncA/C conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004714.
- [16] Walker GC. Inducible DNA repair systems. *Annual Review of Biochemistry*, 1985, 54(1): 425–457.
- [17] Burrus V, Waldor MK. Control of SXT integration and excision. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(17): 5045–5054.
- [18] O'Halloran JA, McGrath BM, Pembroke JT. The *orf4* gene of the enterobacterial ICE, R391, encodes a novel UV-inducible recombination directionality factor, Jef, involved in excision and transfer of the ICE. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 272(1): 99–105.
- [19] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(15): 4259–4269.
- [20] Shen LL, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of the drugs is DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(2): 307–311.
- [21] Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1985, 28(4): 581–586.
- [22] Misumi M, Tanaka N. Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin: a comparative study with fusidic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1980, 92(2): 647–654.
- [23] Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 2004, 305(5690): 1629–1631.
- [24] Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(5): 2438–2441.
- [25] Shaw KJ, Miller N, Liu X, Lerner D, Wan J, Bittner A, Morrow BJ. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2003, 5(2): 105–122.
- [26] Li HG, Li SF. Clinical application of antibiotics and analysis of bacterial resistance. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2001, 11(2): 130–131. (in Chinese)
李宏光, 李淑芬. 临床抗生素应用与细菌耐药性分析. 中华医学感染学杂志, 2001, 11(2): 130–131.
- [27] Li Z, Wang YJ. The situation, problems and countermeasures of the application of antibiotics in livestock farming. *China Animal Health*, 2009(8): 55–57. (in Chinese)
李振, 王云建. 畜禽养殖中抗生素使用的现状、问题及对策. 中国动物保健, 2009(8): 55–57.
- [28] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(9): 3435–3440.
- [29] 李栋. 两种典型抗生素生产废水排放的环境影响研究-抗生素与抗药菌. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2008.
- [30] Yang J, Lu ZY, Hu JC, Gu XS. Advances in biological treatment processes of antibiotic production wastewater. *Environmental Science*, 1997, 18(3): 83–85, 95. (in Chinese)
杨军, 陆正禹, 胡纪萃, 顾夏声. 抗生素工业废水生物处理技术的现状与展望. 环境科学, 1997, 18(3): 83–85, 95.
- [31] Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137–1144.

Effects of antibiotics on the transfer frequency of SXT/R391 element of *Vibrio alginolyticus*

Xiangyan He^{1,2}, Peng Luo^{1*}, Yan Gao^{1,2}, Chaoqun Hu¹, Lu Wei^{1,2}, Qiuting Liu^{1,2}

¹ CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

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

Abstract: [Objective] We studied the effects of nalidixic acid, norfloxacin and kanamycin on the transfer frequency of SXT/R391 element ICEValA056-1 in *Vibrio alginolyticus*. [Methods] The circular ICEValA056-1 in *V. alginolyticus* A056 was detected by PCR. Conjugation experiments were conducted between *V. alginolyticus* A056 and *Escherichia coli* VB111 to explore the frequency variation of the integrating conjugative elements transfer after donor strain A056 was cultured in Luria Broth containing nalidixic acid or norfloxacin or kanamycin in different concentrations for 15 min or 30 min. [Results] Circular ICEValA056-1 was detected in *V. alginolyticus* A056, indicating that ICEValA056-1 had the potential to transfer. Treatment with 40 µg/mL nalidixic acid for 30 min increased the transfer frequency of ICEValA056-1 to 19.59 folds. Treatment with 50 µg/mL norfloxacin for 15 min increased the transfer frequency of ICEValA056-1 to 31.25 folds. The transfer frequency of ICEValA056-1 had no significant changes under treatment with different concentrations of kanamycin for 30 min. [Conclusion] This study indicates that some antibiotics can obviously increase the transfer frequency of ICEValA056-1, and that antibiotics abuse and arbitrarily discharge might intensify dissemination of integrating conjugative elements from *V. alginolyticus* to other bacteria.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*, SXT/R391 element, transfer frequency, antibiotics

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370149) and by the Important Direction Program of CAS Knowledge Innovation Project (KSCX2-EW-G-12B)

*Corresponding author. Tel: +86-20-89023218; E-mail: luopeng@scsio.ac.cn

Received: 30 June 2015; Revised: 15 September 2015; Published online: 21 October 2015