

# 大黄鱼病原弧菌耐药质粒转移研究

鄢庆枇<sup>1,2,3</sup>, 方恩华<sup>3</sup>, 苏永全<sup>2</sup>, 王 军<sup>2</sup>, 庄峙厦<sup>3</sup>

(1. 集美大学水产生物技术研究所、水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋学系、厦门大学亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:**用混合培养法进行耐药质粒从大肠杆菌(*Escherichia coli*)向病原弧菌转移研究, 结果表明, 耐药质粒 pBR322 和 pBR325 可以从大肠杆菌向病原弧菌转移。在混合培养 30 min 后, 部分弧菌获得耐药质粒, 质粒的转化率随着培养时间的延长而增大; 混合培养 24 h 后, 转化率分别提高至  $4.62 \times 10^{-6}$  ~  $1.18 \times 10^{-5}$ 。耐药质粒 pBR322 和 pBR325 在 2 株病原弧菌细胞内能较为稳定地遗传, 在培养初期(0~1 h), 均未出现质粒丢失, 随着培养时间的延长, 有少量细胞因丢失耐药质粒而表现出对药物的敏感性; 培养 72 h 后, 质粒 pBR322 和 pBR325 在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中的丢失率分别为 10% 和 9%, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)中 2 种质粒的丢失率分别为 22% 和 19%。细菌的药敏试验表明不同菌株在获得耐药质粒后对特定药物的抗性大大增强, 但不同菌株的耐药水平有所不同, 说明耐药质粒在不同菌株中的表达水平有所不同。

**关键词:**耐药质粒; 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*); 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*); 质粒转移

中图分类号: S943; S965.322 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)03-0044-06

当前水产养殖由于过分依赖抗生素等化学药物进行疾病防治, 导致养殖水体中耐药菌种类和数量日益增多<sup>[1]</sup>, 并由此引发耐药菌的感染, 使得疾病用常规抗菌药物比较难控制, 最终造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。近年来, 养殖环境中的耐药菌问题已引起了国内外养殖者和学者的重视, 尤其是耐药质粒在病原菌中的传播已引起广泛关注<sup>[2]</sup>。带有抗生素抗性基因的质粒可以通过垂直和水平传播的方式在自然界中广泛传播, 是造成耐药菌增多的主要原因。通过对耐药质粒的研究有助于阐明细菌耐药机理, 提出控制耐药菌出现和流行的对策。作者以耐药质粒 pBR322、pBR325 以及大黄鱼病原菌——溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为研究对象, 研究耐药质粒在病原菌中的转移、遗传和表达, 以期对水产养殖耐药病原菌的控制提供基础理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒

pBR322, 质粒大小为 4362 bp, 含有氨苄青霉素和

四环素 2 个抗药基因。pBR325, 质粒大小为 6000 bp, 含氨苄青霉素、四环素和氯霉素 3 个抗药基因。2 种质粒均购自 SIGMA 公司。

#### 1.1.2 载体菌和病原菌

载体菌——大肠杆菌 JM109 购自 Clontech 公司, 病原菌——溶藻弧菌和副溶血弧菌分离自患病的大黄鱼<sup>[3]</sup>。

#### 1.1.3 抗生素

氨苄青霉素、四环素、氯霉素均购自上海生工公司。

## 1.2 质粒 DNA 导入大肠杆菌

收稿日期: 2003-03-24; 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(819-02-12)

作者简介: 鄢庆枇(1971-), 男, 福建永泰人, 副教授, 博士; 苏永全, 通讯作者, 电话: 0592-2182501, E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

参照《精编分子生物学实验指南》<sup>[4]</sup>和《分子克隆实验指南》<sup>[5]</sup>的方法,用高压电转化的方法进行质粒转导。

### 1.3 细菌质粒 DNA 的提取

采用 UNIQ-10 柱离心式质粒小量抽提试剂盒进行细菌质粒的提取。试剂盒购自上海生工公司。

### 1.4 病原菌耐药质粒的转移

以含有耐药质粒的大肠杆菌为供体菌,以不耐药的病原菌为受体菌。分别将供体菌和受体菌接种在 LB 培养液中,适温过夜培养,然后各取 1mL 接种于 LB 培养液,30℃ 恒温培养,每隔一段时间取出少量培养液进行 10 倍系列稀释,取适当稀释度菌液 0.1 mL 分别涂布于含 200 mg/L 四环素和不含四环素的 TCBS 平板,30℃ 恒温培养 24 h,计算菌落数。能在含 200 mg/L 四环素 TCBS 平板上生长的即为转入耐药质粒的病原菌。而在不含四环素 TCBS 平板上生长的是总病原菌。按下列公式计算转化率:转化率 = 已转入耐药质粒的弧菌数/总弧菌数。

### 1.5 病原菌耐药质粒的稳定性检测

将含耐药质粒的病原菌接种于 LB 培养液,30℃ 恒温培养,每隔一段时间取出少量培养液进行 10 倍系列稀释,分别从不同稀释度各取 0.1 mL 涂布于不含四环素的 TCBS 平板,用灭菌牙签从 TCBS 平板上随机挑取 100 个单菌落,接种到含 200 mg/L 四环素的 TCBS 平板,30℃ 恒温培养 24 h,计数平板上的菌落数。

### 1.6 转质粒前后不同菌株对抗生素的敏感性

用倍比稀释法测定不含耐药质粒和含有耐药质粒的大肠杆菌和病原弧菌各菌株对不同抗生素的敏感性。将菌株接种于 LB 培养液中,适温培养 5~6 h,然后取 0.1 mL 菌液到含有不同浓度抗生素的 LB 培养液中,适温培养 24 h,观察培养液是否因细菌生长繁殖而浑浊。以不接种细菌的培养液为阴性对照,以接种细菌不含抗生素的培养液为阳性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌耐药质粒的转移

将病原弧菌和含耐药质粒的大肠杆菌进行混合培养,经过一段时间的培养,有少量弧菌能够在含抗生素的 TCBS 平板上生长,形成菌落。这说明耐药质粒可以在大肠杆菌和病原弧菌之间进行水平转移。

耐药质粒在弧菌与大肠杆菌之间的转移频率与时间有密切关系。在混合培养 30 min 后,就有部分弧菌获得耐药质粒,但此时转化率较低,只有  $1.82 \times 10^{-7} \sim 9.0 \times 10^{-7}$ 。随着培养时间的延长,获得耐药质粒的弧菌的数量和转化率都明显增加,混合培养 24 h 后,转化率分别提高至  $4.62 \times 10^{-6} \sim 1.18 \times 10^{-5}$  (表 1、表 2)。

质粒的转化率除了与时间密切相关外,还与质粒本身以及受体菌有关。2 株病原弧菌对同一质粒的转移频率不同,同一菌株对不同质粒的转化率也有所不

表 1 副溶血弧菌对 pBR322 和 pBR325 的转化率

Tab.1 Transfer rate of pBR322 and pBR325 to *Vibrio parahaemolyticus*

质粒	培养时间 (h)	转质粒弧菌数 (cfu/mL)	总副溶血弧菌数 (cfu/mL)	转化率
pBR322	0	0	$7.8 \times 10^7$	0
	0.5	25	$1.3 \times 10^8$	$1.82 \times 10^{-7}$
	1	60	$1.8 \times 10^8$	$3.33 \times 10^{-7}$
	8	$2.45 \times 10^2$	$4.0 \times 10^8$	$6.12 \times 10^{-7}$
	24	$9.35 \times 10^3$	$1.7 \times 10^9$	$5.5 \times 10^{-6}$
	48	$1.33 \times 10^5$	$1.8 \times 10^9$	$7.39 \times 10^{-5}$
pBR325	0	0	$9.2 \times 10^7$	0
	0.5	40	$1.54 \times 10^8$	$2.60 \times 10^{-7}$
	1	95	$2.15 \times 10^8$	$4.42 \times 10^{-7}$
	8	$5.3 \times 10^2$	$4.5 \times 10^8$	$1.18 \times 10^{-6}$
	24	$8.45 \times 10^3$	$1.83 \times 10^9$	$4.62 \times 10^{-6}$
	48	$1.04 \times 10^5$	$1.94 \times 10^9$	$5.36 \times 10^{-5}$

同。对于同一质粒,无论是 pBR322 还是 pBR325,溶藻弧菌的转化率均高于副溶血弧菌。由此可见,溶藻弧

菌比副溶血弧菌更易获得外源质粒。从同一菌株对不同质粒的转化率来看,溶藻弧菌对质粒 pBR322 的转

表 2 溶藻弧菌对 pBR322 和 pBR325 的转化率

Tab.2 Transfer rate of pBR322 and pBR325 to *V. alginolyticus*

质粒	培养时间 (h)	转质粒弧菌数 (cfu/mL)	总溶藻弧菌数 (cfu/mL)	转化率
pBR322	0	0	$6.65 \times 10^7$	0
	0.5	$1.0 \times 10^2$	$1.11 \times 10^8$	$9.0 \times 10^{-7}$
	1	$2.35 \times 10^2$	$1.66 \times 10^8$	$1.42 \times 10^{-6}$
	8	$7.0 \times 10^2$	$4.39 \times 10^8$	$1.59 \times 10^{-6}$
	24	$2.42 \times 10^4$	$2.05 \times 10^9$	$1.18 \times 10^{-5}$
	48	$8.7 \times 10^5$	$4.69 \times 10^9$	$1.85 \times 10^{-4}$
pBR325	0	0	$3.65 \times 10^7$	0
	0.5	15	$5.05 \times 10^7$	$2.97 \times 10^{-7}$
	1	35	$7.4 \times 10^7$	$4.73 \times 10^{-7}$
	8	$3.4 \times 10^2$	$2.28 \times 10^8$	$1.49 \times 10^{-6}$
	24	$1.12 \times 10^4$	$1.52 \times 10^9$	$7.37 \times 10^{-6}$
	48	$3.4 \times 10^5$	$2.08 \times 10^9$	$1.63 \times 10^{-4}$

化率要高于质粒 pBR325。副溶血弧菌在混合培养初期(0.5~8 h)对质粒 pBR325 的转化率较高,在混合培养后期(24~48 h)对质粒 pBR322 的转化率较高。

### 2.2 病原菌耐药质粒的稳定性

将病原菌接种于 LB 培养液中培养一段时间后,培养液中绝大多数的细胞都能在含 200 mg/L 四环素的 TCBS 平板上生长,表明质粒 pBR322 和 pBR325 在两株病原弧菌细胞内都能稳定传代,特别在培养初期(0~1 h),都没有出现细胞因质粒丢失而不能在带药 TCBS 平板上生长的现象。随着培养时间的延长,细菌繁殖世代数的增加,就有少量细胞因丢失耐药质粒而表现出对药物的敏感性,不能在含 200 mg/L 四环素的 TCBS 平板上生长。培养 72 h 后,质粒 pBR322 和 pBR325 在副溶血弧菌中的丢失率分别为 10% 和 9%,而同期溶藻弧菌中 2 种质粒的丢失率分别为 22% 和 19%,由此说明质粒 pBR322 和 pBR325 在副溶血弧菌细胞中的稳定性要高于溶藻弧菌(表 3、表 4)。

### 2.3 转质粒前后不同菌株对抗生素的敏感性

在进行质粒转移之前,由于细胞内没有耐药质粒,各菌株对抗生素比较敏感。在转入耐药质粒之后,各菌株对抗生素的抗性大大增强(表 5、表 6)。由于不同细菌生理代谢有所不同,耐药质粒在不同菌株中编码的耐药水平也不相同。2 种质粒在大肠杆菌中表现的耐药水平高于 2 株弧菌,在 2 株病原菌中的表达也略有不同。

表 3 质粒 pBR322 在病原弧菌细胞内的稳定性

Tab.3 The stableness of pBR322 inside the cells of pathogenic *Vibrio*

病原弧菌	培养时间 (h)	接种菌落数 (个)	生长菌落数 (个)	丢失率 (%)
副 溶 血 弧 菌	0	100	100	0
	1	100	100	0
	8	100	100	0
	24	100	100	0
	48	100	100	0
	72	100	90	10
溶 藻 弧 菌	0	100	100	0
	1	100	100	0
	8	100	99	1
	24	100	98	2
	48	100	96	4
	72	100	78	22

## 3 讨论

由耐药性细菌引起的疾病用常规药物无法防治,因此耐药质粒对水产养殖具有很大的危害,引起各国学者的重视。鱼类病原菌中的耐药菌最早发现于 1971 年, Aoki 等<sup>[6,7]</sup>从鱼类病原菌 *Aeromonas liquefaciens* 和 *A. salmonicida* 中检测到耐药质粒。从此以后,不少学者从更多的鱼类病原菌中分离出耐药质粒,到

表 4 质粒 pBR325 在病原弧菌细胞内的稳定性

Tab. 4 The stableness of pBR325 inside the cells of pathogenic *Vibrio*

病原弧菌	培养时间 (h)	接种菌落数 (个)	生长菌落数 (个)	丢失率 (%)
副溶血弧菌	0	100	100	0
	1	100	100	0
	8	100	100	0
	24	100	100	0
	48	100	98	2
	72	100	91	9
溶藻弧菌	0	100	100	0
	1	100	100	0
	8	100	100	0
	24	100	98	2
	48	100	95	5
	72	100	81	19

表 5 转入质粒前后各菌株对四环素的敏感性

Tab.5 The sensitivity of different strains to Tetracycline before and after the transfer of plasmid

转化状况	浓度(g/L)	大肠杆菌	溶藻弧菌	副溶血弧菌
转	25	-	-	-
	20	-	-	-
化	15	-	-	-
	10	-	-	-
前	5	+	-	-
	25	+	-	-
	α(对照)	+	+	+
转	150	-	-	-
	125	-	-	-
	100	+	-	-
化	80	+	+	-
	60	+	+	+
后	50	+	+	+
	40	+	+	+
	30	+	+	+
α(对照)		+	+	+

注：+ 表示细菌生长；- 表示细菌不生长(下同)

目前为止,从鱼类中已检出耐药质粒的主要病原菌有 *A. liquefaciens*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus* 及 *Marine vibrio* 等<sup>[8-12]</sup>。在已分离的耐药质粒中,以对氨苄青霉素(AP)、四环素(TC)、磺胺药(SA)、氯霉素(CM)、链霉素(SM)和卡那

表 6 转入质粒前各菌株对氯霉素的敏感性

Tab.6 The sensitivity of different strains to Chloramphenicol before and after the transfer of plasmid of pBR325

转化状况	浓度(g/L)	大肠杆菌	溶藻弧菌	副溶血弧菌
转	15	-	-	-
	10	-	-	-
	8	-	-	-
	5	+	-	-
	3	+	-	-
	1	+	+	+
α(对照)		+	+	+
化	100	+	-	-
	80	+	+	+
	60	+	+	+
	50	+	+	+
	40	+	+	+
	30	+	+	+
后	20	+	+	+
	10	+	+	+
	α(对照)	+	+	+

霉素(KM)等抗生素的耐药性最为常见。

接合转移是一个通过细胞间紧密接触而获得以质粒为中介的 DNA 转移,接合现象广泛存在于各类细菌中。细菌质粒可分为转移性和非转移性两类。其中耐药质粒属于转移性质粒,可以通过细菌接合使质粒在同种和非同种细菌间进行传播。细菌质粒的接合转移使得细菌可以从周围耐药性细菌中获得耐药质粒而产生对特定药物的抗性,再加上药物的选择压力,导致耐药菌在某些区域流行,给疾病的防治带来很大的困难。Guiney<sup>[13]</sup>认为 R 质粒可以在非常广泛的宿主间进行转移。Gauthler 等<sup>[12]</sup>、Goodman 等<sup>[14]</sup>进行了海水中耐药质粒转移研究。李爱华<sup>[15]</sup>进行了耐药质粒从鱼类病原菌向大肠杆菌转移的试验。结果表明,在混合培养 15 min 内即可有质粒转移,转化率随培养时间的增加,从 15 min 时的  $7.1 \times 10^{-6}$  提高到 24 h 的  $1.0 \times 10^{-1}$ 。本实验的转化率在  $1.82 \times 10^{-7} \sim 1.85 \times 10^{-4}$  之间。这个结果比李爱华的结果低了 2~3 个数量级。李军<sup>[16]</sup>等进行了弧菌耐药质粒的转移,在过夜培养后,其转化率在  $3.1 \times 10^{-11} \sim 8.6 \times 10^{-9}$  之间,低于本实验的结果。Kruse 等<sup>[17]</sup>进行了自然环境中耐药质粒的转移实验,其结果为:在海水中,20 °C 培养 24 h

的转移频率为  $6 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-5}$ 。与本实验结果差不多。本实验结果表明耐药质粒可以在病原弧菌和大肠杆菌之间转移,其转化率随着培养时间的延长而增加,在混合培养 0.5~48 h 时间内,耐药质粒的转化率在  $1.82 \times 10^{-7} \sim 1.85 \times 10^{-4}$  之间。由于在养殖水体中弧菌的数量相当可观,而且不同细菌长期混杂生活在一起,因此在养殖环境中出现含有耐药质粒弧菌的机率相当大。天然存在的质粒一般都能稳定遗传,这是由于质粒在宿主细胞内能够复制并分配到子细胞中。有些质粒进化了使没有遗传子代质粒的细胞不能存活的机制,有的质粒如 F 因子,当细胞中只剩一个拷贝时,质粒还有抑制细胞分裂的系统,即 ccd 系统,以保证遗传了质粒的细胞在细胞群体中处于优势地位<sup>[18]</sup>。本实验结果表明质粒 pBR322 和 pBR325 在 2 株病原弧菌中能够稳定遗传,在不存在药物选择压力的分批培养情况下,培养 48 h 后其质粒的丢失率不超过 5%。陈莹<sup>[19]</sup>等进行了质粒 pSUP101GFP 在大肠杆菌和嗜水气单胞菌中的稳定性研究,结果发现含有该质粒的大肠杆菌在 LB 培养液中培养 7 d 尚无质粒丢失,而含该质粒的嗜水气单胞菌在同样培养条件下培养 36 h 即有 50% 的菌体没有质粒。

耐药质粒在不同的宿主中,编码的耐药水平是不同的<sup>[15]</sup>,这与不同宿主的生理代谢有关。本试验结果表明,pBR322 和 pBR325 在两株弧菌中编码的耐药水平低于大肠杆菌。这可能与 pBR322 和 pBR325 最初是从大肠杆菌细胞中分离有关,也可能与在不同宿主中的拷贝数有关。有关耐药质粒在不同细菌中的表达有待进一步研究。

目前,在养殖环境中大量耐药菌的存在,由于耐药质粒的水平传播和药物的选择压力,耐药菌的种类、数量和菌群中的比例都会增加。如果能够了解致病菌耐药质粒的起源和流行规律,就可以提出有效的细菌耐药性的防治措施。同时,如果能找到有效的质粒消除剂或质粒转移抑制剂<sup>[20]</sup>,对防止耐药性传播也将具有重要的意义。除此之外,开发研制不能通过质粒介导耐药的新一代抗菌药物(如喹诺酮类药物)也是解决问题的一种手段。

#### 参考文献:

- [1] 李爱华,王伟俊. 鱼类病原菌耐药质粒的研究概况[J]. 鱼类病害研究,1997,19(3-4):1-10.
- [2] 邓子新. 细菌质粒的研究现状和动态[A]. 盛祖嘉,陈永青. 微生物遗传学综述文集[C]. 上海:复旦大学

出版社,1993. 119-124.

- [3] 鄢庆彬,苏永全,王军,等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2001,6(3):191-196.
- [4] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 RE,等. 颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999. 1-837.
- [5] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999. 1-987.
- [6] Aoki T, Egusa S, Ogata Y, et al. Detection of resistance factors in fish pathogen *A. liquefaciens*[J]. **Journal of General Microbiology**,1971,65:343-349.
- [7] Aoki T, Egusa S, Kimura T, et al. Detection of R factors in naturally occurring *A. salmonicida* strains[J]. **Applied Microbiology**,1971,22:716-717.
- [8] Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R, et al. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens[J]. **Infection and Immunity**,1983,39:184-192.
- [9] Takashima N, Aoki T, Kitao T. Epidemiological surveillance of Drug-resistant strains of *Pasturella piscicida*[J]. **Fish Pathology**,1985,20:209-217.
- [10] Starliper C E, Cooper II R K, Shotts E B. Plasmid-mediated Romet resistance of *Edwardsiella ictaluri*[J]. **Journal of Aquatic Animal Health**,1993,5:1-8.
- [11] Guiney D G. Host range of conjugation and replication functions of the *Escherichia coli* sex plasmid F<sup>+</sup>lac: Comparison with the broad-host-range plasmid RK2[J]. **Journal of Molecular Biology**,1982,162:699-703.
- [12] Gauthier M J, Breittmayer V A. Gene transfer in marine environments[A]. Fry J C, Day M J. Bacterial genetics in natural environments[C]. London:Chapman and Hall[J],1990. 100-110.
- [13] Guiney D G. Host range of conjugation and replication functions of the *Escherichia coli* sex plasmid F<sup>+</sup>lac: Comparison with the broad-host-range plasmid RK2[J]. **Journal of Molecular Biology**,1982,162:699-703.
- [14] Goodman A E, E Hild, K C Marshall, et al. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1993,59:1035-1040.
- [15] 李爱华. 鱼类病原菌中 R 质粒的检出及其特性[J]. 水生生物学报,1998,22(4):319-324.
- [16] 李军,叶军,傅慰亭,等. 香港养殖海鲷弧菌致病菌药物敏感性及其耐药质粒研究[J]. 微生物学报,1999,39

- (5):461 – 468.
- [17] Kruse H, Henning S. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments[J]. **Applied and Environmental Microbiology** ,1994, **60**(11):4 015 – 4 021.
- [18] Trieu – Cuot P. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *E. coli*[J]. **Journal of Bacteriology** , 1988, 170:4 388 – 4 391.
- [19] 陈 营, 夏晓勤, 陆承平. 绿色荧光蛋白标记可移动载体质粒的构建及其在嗜水气单胞菌的表达[J]. 农业生物技术学报, 1999, (4):329 – 332.
- [20] Briand Y M, Laporte J M. Inhibition of conjugal transfer of R Plasmids by nitrofurans[J]. **Journal of Gene Microbiology** ,1985, 131:2 281 – 2 284.

## Transfer of drug resistance plasmids from *Escherichia coli* to pathogenic *vibrio*

YAN Qing – pi<sup>1,2,3</sup>, FANG En – hua<sup>3</sup>, SU Yong – quan<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, ZHUANG Zhi – xia<sup>3</sup>

(1. Institute of Aquaculture Biotechnology & Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Department of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Received:** Mar., 24, 2003

**key words:** drug – resistant plasmid; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio parahaemolyticus*; transfer of plasmid

**Abstract :** The transfer of drug – resistant plasmid from *Escherichia coli* to pathogenic vibrios was studied by mixed culturing. Results showed that plasmid pBR322 and pBR325 could be transferred from *E. coli* to pathogenic vibrios. Some tested *vibrio* could be obtained plasmid within 30min of mixed culturing. The transfer rate of plasmid increased with increasing culture time at 24h the transfer rate was  $4.62 \times 10^{-6} \sim 1.18 \times 10^{-5}$ . Drug – resistant plasmid pBR322 and pBR325 were in pathogenic *vibrio*. In the initial stages of culture, no plasmid was lost, but as the culture time increased, some *vibrio* would lose plasmid and became sensitive to antibiotic. 72h after culture, plasmids pBR322 and pBR325 lost in *V. parahaemolyticus* were 10% and 9% respectively, while in *V. alginolyticus*, 22% and 19% was lost. Bacterial drug – resistance level increased significantly after plasmid was obtained, but variety was seen between different bacteria indicating the expression level of drug – resistant plasmid varied.

(本文编辑:刘珊珊)