

研究报告

新疆动物源大肠杆菌小菌落变异体生物学特性分析

吴自豪¹, 李广西², 刘士哲², 陈伟^{*1,2}

1 塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室, 新疆 阿拉尔 843300

2 塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

吴自豪, 李广西, 刘士哲, 陈伟. 新疆动物源大肠杆菌小菌落变异体生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4976-4987.

WU Zihao, LI Guangxi, LIU Shizhe, CHEN Wei. Biological characterization of small colony variants (SCVs) of *Escherichia coli* from animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4976-4987.

摘要: 【背景】小菌落变异体(small colony variants, SCVs)在细菌耐药和持续残留等过程中发挥着重要作用, 但目前国内鲜有动物源大肠杆菌(*Escherichia coli*, EC) SCVs的相关报道。【目的】对新疆动物源 EC-SCVs的生物学特性进行对比研究分析, 为国内 EC-SCVs的相关研究提供基础数据。【方法】使用氨基糖苷类抗生素对新疆动物源大肠杆菌进行诱导, 使其形成 SCVs。然后对野生株和诱导株进行培养特征、生化特性、药物敏感性、运动力、生物被膜和溶血活性等生物学特性检测。【结果】经卡那霉素和庆大霉素诱导, 从牛、羊和马源大肠杆菌中得到 5 株 EC-SCVs (2 株为血红素依赖型, 3 株未知其营养依赖型)。与野生株相比, EC-SCVs 的生化特性改变, 所有 EC-SCVs 转变为不利用醋酸盐, 在不同培养基中的培养特征也存在差异。并且对氨基糖苷类抗生素的耐受性增强, 生物被膜形成能力增强, 但运动力下降。除血红素依赖型 EC-SCVs 的溶血活性增强外, 其他 SCVs 的溶血活性并无差异。【结论】动物源 EC-SCVs 的生物学特性与野生株相比有较大差异, 这些生物学特性的改变可能会给大肠杆菌致病或耐药等方面的防治带来更大挑战, 其相关机制还有待深入研究。

关键词: 大肠杆菌; 小菌落变异体; 生物学特性

资助项目: 塔里木大学研究生科研创新项目(TDGRI202101); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划(2020AB025)

This work was supported by the Postgraduate Student Research and Innovation Project of Tarim University (TDGRI202101) and the Key Scientific and Technological Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2020AB025).

*Corresponding author. E-mail: L187369315@163.com

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-04-13; Published online: 2023-05-18

Biological characterization of small colony variants (SCVs) of *Escherichia coli* from animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China

WU Zihao¹, LI Guangxi², LIU Shizhe², CHEN Wei^{*1,2}

1 Engineering Laboratory for Tarim Animal Diseases Diagnosis and Control of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

2 College of Animal Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Small colony variants (SCVs) play a role in the antibiotic resistance and persistent residues of bacteria, while little is known about the *Escherichia coli* (EC) SCVs from animals in China. [Objective] To study the biological characteristics of EC-SCVs from animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China, so as to provide basic data for the related studies of EC-SCVs. [Methods] EC from the animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China was induced with aminoglycosides to form SCVs. The cultural characteristics, biochemical properties, susceptibility to antibiotics, motility, biofilm formation, and hemolytic activities of the wild type and SCVs were examined. [Results] Five strains of EC-SCVs (2 heme-dependent and 3 unknown nutrient-dependent) were obtained from bovine, sheep, and horse by induction with kanamycin or gentamicin. EC-SCVs showed different biochemical characteristics from the wild type. All the EC-SCVs did not utilize acetate and showed varied cultural characteristics in different media. Moreover, they presented enhanced tolerance to aminoglycosides, increased biofilm formation, and decreased motility. Except that the hemolytic activity of heme-dependent EC-SCVs enhanced, the hemolytic activities of other SCVs changed little. [Conclusion] The biological properties of animal-derived EC-SCVs are different from those of the wild type, and these changes may pose great challenges to the prevention and control of the infectivity or drug resistance of *E. coli*. The related mechanisms remain to be studied in depth.

Keywords: *Escherichia coli*; small colony variants; biological characteristics

大肠杆菌(*Escherichia coli*, EC)是一种既在自然界如水、空气和土壤等中广泛存在,又可以寄生在人和哺乳动物肠道、泌尿生殖道或乳房等组织中的人畜共患菌。在正常情况下,寄居于肠道的大肠杆菌是肠道正常菌群的组成成员,但当肠道内正常菌群中的大肠杆菌(通常为非致病性大肠杆菌)寄生部位发生改变或有致病性大肠杆菌(肠外致病性大肠杆菌或肠道致病性大肠杆菌等)侵入时,可以引起多种人畜疾病,如腹泻、尿路感染、脑膜炎、腹膜炎、败

血症、肺炎和奶牛乳腺炎等^[1-2]。同时,大肠杆菌也是医院临床和细菌性食物中毒的主要病原菌之一。因此,大肠杆菌的感染(或污染)给公共卫生安全与食品生产安全带来严重威胁。

随着研究的深入,多种病原菌的特殊形式被相继报道,如生物被膜(biofilm, BF)、持留性细胞(persister cell, PC)和小菌落变异体(small colony variants, SCVs)等。其中细菌 SCVs 因其耐药性和持留能力增强而被认为有更大的公共卫生安全和食品生产安全隐患,从而被越来越

多的科研工作者关注^[3]。SCVs 是细菌在抗生素或其他恶劣条件下诱导形成的一种特殊存在形式,通常表现为电子传递受阻或缺失,ATP合成不足,代谢缓慢,是正常菌落大小的1/10,可对多种抗生素表现出耐药性^[4-7]。不仅如此,SCVs 可以使细菌隐藏在宿主细胞内而不引起强烈的宿主反应,实现免疫逃避,造成持续性复发感染,给临床治疗带来很大困难^[8-9]。这种特殊的细菌生存形式可能并不与某一种药物的耐受性直接相关,但其特殊的生理生化代谢方式却可以使病原菌对多种药物耐受^[5-6]。随着研究的深入,研究者发现了这些特殊的细菌存在形式,不但形成原因复杂,能不断发生变化和转化,在细菌耐药和持续残留等过程中发挥着重要作用,并且广泛存在于细菌中^[3]。

目前关于细菌 SCVs 的感染、宿主体内滞留和耐药机制的研究多来自金黄色葡萄球菌,但已有相关报道称数十种细菌均可形成 SCVs^[3]。国内外关于 EC-SCVs 的报道较少,大部分来自临床病例或体外诱导,通常会造成疾病的反复发作与慢性感染^[10]。关于动物源大肠杆菌的报道则更少,因此本研究选用氨基糖苷类抗生素诱导动物源大肠杆菌形成 SCVs,并比较分析野生株和 SCVs 在生理生化特性、药物敏感性、运动力、溶血活性和生物被膜形成能力等方面的差异,探究大肠杆菌及其 SCVs 的生物学特性差异,以期为国内动物源 EC-SCVs 的相关研究提供基础试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

动物源大肠杆菌分别来源于新疆的奶牛(6株,巴音郭楞蒙古自治州)、绵羊(10株,阿克苏地区)和马(4株,伊犁地区),对照菌株大肠杆菌 ATCC 25922 (*phoA* 阳性菌株)和表皮葡

萄球菌 ATCC 35984 (强生物被膜形成能力)保存于新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室;健康绵羊血由新疆生产建设兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室提供。

PCR 引物、Tris-HCl、SDS、EDTA 和 *Taq* PCR Master Mix (2×)试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;药敏片,温州市泰康生物科技有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂/液体培养基 (tryptic soy agar, TSA; tryptic soy broth, TSB)、水解酪蛋白胨琼脂/液体培养基(Mueller-Hinton agar, MHA; Mueller-Hinton broth, MHB)、麦康凯培养基(MacConkey, MAC)、伊红美蓝培养基 (eosin-methylene blue medium, EMB)、哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar, CBA)和营养肉汤/琼脂(nutrient broth, NB; nutrient agar, NA),青岛海博生物科技有限公司;甲萘醌(menadione, VK₃)、氯化血红素(heme, H)和胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine, TD),北京索莱宝科技有限公司;EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit,北京全式金生物科技有限公司;放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(无抑制剂),上海碧云天生物科技有限公司。PCR 仪、凝胶成像系统和电泳仪, Bio-Rad 公司;高通量实时微生物生长分析仪,天津杰灵仪器制造有限公司。

运动力培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0,阿拉伯糖 1.5,琼脂 3.0。

1.2 大肠杆菌 SCVs 的诱导和筛选

将大肠杆菌从甘油管中划线接种在 TSA 平板上 37 °C 培养过夜,然后将复苏后的菌株转接在 5 mL TSB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 4-6 h 后,将菌悬液用无菌生理盐水稀释至 1×10⁶ CFU/mL。取 200 μL 稀释后的菌悬液均匀涂布于 TSA 平皿上,将含有 30 μg/片的卡那霉素滤纸片和含有 5 μg/片的庆大霉素滤纸片贴于

TSA 表面, 37 °C 培养 18–24 h, 得到 F1 代。蘸取 F1 代抑菌圈边缘单菌落或菌苔接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 24–56 h, 然后划线分离纯化, 观察是否有生长缓慢、呈针尖状的小菌落出现。若无特征菌落出现, 则将 F1 代细菌悬液用无菌生理盐水稀释至 1×10^6 CFU/mL, 取 200 μ L 稀释后的菌悬液涂布于 TSA 上, 增加抗生素浓度(随着传代次数依次增加抗生素含量)再重复上述步骤(卡那霉素含量: F2 代: 60 μ g/片; F3 代: 90 μ g/片; F4 代: 120 μ g/片。庆大霉素含量: F2 代: 10 μ g/片; F3 代: 20 μ g/片; F4 代: 40 μ g/片), 直到有特征菌落出现或至抗生素含量最高^[11]。将标记为第 1 代的大肠杆菌 SCVs 菌株在血平板上进行传代培养, 传代 10 次及以上以验证其稳定性。

1.3 大肠杆菌及其 SCVs 的特异性基因检测和 MLVA 分析

按照 EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit 操作流程和要求提取大肠杆菌及其 SCVs 的基因组 DNA。以大肠杆菌标准菌株 ATCC 25922 为阳性对照, 使用引物 *phoA*-F (5'-CGATTCTGGA AATGGCAAAG-3')和 *phoA*-R (5'-CGTGATC AGCGGTGACTATGAC-3')^[12] PCR 扩增大肠杆菌及其 SCVs 特异性 *phoA* 基因, 预期扩增产物大小为 720 bp。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 40 s, 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min^[12]。PCR 反应体系按照 Taq PCR Master Mix (2 \times)试剂盒说明书配制。

多位点可变数目串联重复序列分析(multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)是一种基于 PCR 技术的分型方法, 通过区分基因组上多个具有多态性串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)位点的重复数来区分菌株。参考文献[13]中的试验方法对大肠杆菌及其 SCVs 进行 MLVA 分析, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s,

72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

1.4 大肠杆菌 SCVs 的营养缺陷型测试

将大肠杆菌 SCVs 转接至 TSB 培养基中 37 °C、180 r/min 恒温培养过夜, 然后将菌悬液涂布于 TSA 培养基上, 分别滴加 10 μ L 5 mg/mL 的甲萘醌、氯化血红素和胸腺嘧啶脱氧核苷于 TSA 培养基上, 在有氧条件下 37 °C 恒温培养 24–48 h。同时将大肠杆菌 SCVs 划线接种于血平板上, 在 5% CO₂ 的条件下 37 °C 恒温静置培养 24–48 h, 观察是否有回复现象。

1.5 大肠杆菌及其 SCVs 培养特性和生化试验

将大肠杆菌及其 SCVs 划线接种于麦康凯、伊红美蓝、胰蛋白胨大豆琼脂培养基和营养琼脂上, 置于 37 °C 恒温培养 24 h 观察其在不同培养基上的生长情况。

分别以大肠杆菌 ATCC 25922 和无菌生理盐水为阳性和空白对照, 按照生产厂家的操作说明, 使用微量生化鉴定管对大肠杆菌及其 SCVs 进行糖类(葡萄糖、乳糖、山梨醇、甘露醇)分解试验、触酶试验、硝酸盐还原试验和醋酸盐利用试验。

1.6 大肠杆菌及其 SCVs 生长曲线测定和胞内 ATP 含量测定

使用高通量实时微生物生长分析仪对大肠杆菌及其 SCVs 进行生长曲线的测定, 先将待测菌株接种于 TSB 培养基中 37 °C、180 r/min 恒温培养过夜, 然后按体积比 1:200 接种于 TSB 培养基, 放入仪器中检测, 总体积为 1 mL, 37 °C、800 r/min 恒温培养 24 h。

参照 ATP 检测试剂盒生产厂家的操作要求与标准, 将大肠杆菌与 SCVs 培养液于 8 000 r/min 离心 2 min 后去除上清液, 然后使用 RIPA (无抑制剂)细胞裂解液处理后 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清按照试剂盒操作要求进行胞内 ATP 含量测定。

1.7 大肠杆菌及其 SCVs 运动力比较

使用新鲜的运动力培养基对大肠杆菌及其 SCVs 是否有运动力进行半定量检测。将配制好的新鲜运动力检测平板干燥 15 min, 将培养至对数期(野生株、25-1-S、1-12-S 在 TSB 中 37 °C、180 r/min 恒温培养 5 h; 21-2-S、L16-1-S、L16-1-S-CN 在 TSB 中 37 °C、180 r/min 恒温培养 8 h)的菌悬液稀释至 1×10^7 CFU/mL, 取 2 μ L 稀释后的菌悬液滴加在运动力检测平板上, 37 °C 恒温培养 24 h 后测量其运动直径^[14]。

1.8 大肠杆菌及其 SCVs 溶血活性的测定

以含有 3% 绵羊红细胞的 ddH₂O 混合液为阳性对照, 以含 3% 绵羊红细胞的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)混合液为阴性对照。将菌株接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温培养过夜复苏后转接在 5 mL TSB 培养基, 37 °C、180 r/min 恒温培养过夜, 12 000 r/min 离心 2 min 收集细菌培养上清液, 取 100 μ L 加入 900 μ L 含 3% 绵羊血细胞的 PBS 混合液, 37 °C 孵育 30 min 后 8 000 r/min 离心 2 min, 在 540 nm 处测定上清液溶血程度^[15]。

1.9 大肠杆菌及其 SCVs 生物被膜形成能力检测

以表皮葡萄球菌 ATCC 35984 为阳性对照, 以等体积的 TSB 培养基为空白对照, 用 96 孔板法半定量测定大肠杆菌及其 SCVs 形成生物被膜的能力。操作方法为: 将菌株接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温培养过夜复苏, 转接到 TSB 培养基中培养至菌液呈云雾状, 然后用新鲜的 TSB 培养基以体积比 1:100 稀释, 吸取 200 μ L 稀释液至 96 孔板中。37 °C 静置培养 48 h 后, 用无菌水洗去未黏附细菌。56 °C 烘干固定, 用 0.5% 结晶紫染色 5 min, 冲洗、晾干后使用丙酮:乙醇(体积比为 2:8)进行溶解, 测定 OD_{570} ^[16]。

1.10 大肠杆菌及其 SCVs 的药物敏感性检测

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2017)指南标准操作和判断标准, 以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌株, 采用纸片扩散法对大肠杆菌及其 SCVs 进行八大类 17 种药物敏感性检测。包括 β -内酰胺类的亚胺培南(imipenem, IPM)、青霉素(penicillin, P)、氨苄西林(ampicillin, AMP)和头孢噻吩(cefalotin, KF), 四环素类的替加环素(tigecycline, TGC)和四环素(tetracycline, TE), 喹诺酮类的诺氟沙星(norfloxacin, NOR)和恩诺沙星(enrofloxacin, ENR), 氯霉素类的氟苯尼考(flornfenicol, FFC)和氯霉素(chloramphenicol, C), 磺胺类的复方新诺明(sulfamethoxazole-trimethoprim, SXT), 氨基糖苷类的卡那霉素(kanamycin, K)、庆大霉素(gentamicin, CN)、链霉素(streptomycin, S)和阿米卡星(amikacin, AK), 利福霉素类的利福平(rifampicin, RD), 多肽类的多黏菌素 B (polymyxin B, PB)。

1.11 数据分析

使用 GraphPad Prism 7 软件分析数据(*t* 检验)并作图, $P < 0.05$ 表明具有显著性差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: 差异不显著)。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 SCVs 的筛选

使用氨基糖苷类抗生素对 20 株动物源大肠杆菌进行诱导, 挑取抑菌圈边缘出现无色透明状的单菌落/菌苔, 然后转接于 TSB 中。其中 4 株大肠杆菌(编号为 25-1、1-12、21-2 和 L16-1)的诱导株生长缓慢, 经 10 次传代确定其稳定性, 标记为大肠杆菌 SCVs 菌株(编号为 25-1-S、1-12-S、21-2-S、L16-1-S 和 L16-1-S-CN)。详见表 1。

表 1 菌株来源与诱导结果

Table 1 Source of strains and induction results

野生菌株 Wild strain	来源 Source	系统发育群 Phylogenetic group	SCVs 编号 SCVs No.	诱导药物 Antimicrobial	营养依赖型 Nutrition-dependent
L16-1	绵羊 Sheep	A	L16-1-S-CN	庆大霉素 Gentamicin (5 µg)	血红素 Heme
			L16-1-S	卡那霉素 Kanamycin (60 µg)	血红素 Heme
25-1	马 Horse	B1	25-1-S	卡那霉素 Kanamycin (30 µg)	未知 Unknown
1-12	奶牛 Cow	B1	1-12-S	卡那霉素 Kanamycin (60 µg)	未知 Unknown
21-2	马 Horse	B1	21-2-S	卡那霉素 Kanamycin (120 µg)	未知 Unknown

2.2 大肠杆菌及其 SCVs 的特异性基因检测和 MLVA 分析结果

所有大肠杆菌及其 SCVs 均扩增出大肠杆菌的特异性基因 *phoA* (图 1), 并且 MLVA 分析表明大肠 SCVs 和野生株并无差异(图 2)。

2.3 大肠杆菌 SCVs 的营养缺陷型测试结果

EC-SCVs 菌株 L16-1-S 和 L16-1-S-CN 在滴加血红素的周围出现回复现象, 在甲萘醌、胸腺嘧啶脱氧核苷和 CO₂ 培养下未出现回复现象(图 3)。21-2-S、1-12-S 和 25-1-S 在血红素、甲萘醌、胸腺嘧啶脱氧核苷或 CO₂ 培养条件下均未出现回复现象, 不属于这 4 种常见的营养缺陷型 SCVs。

2.4 大肠杆菌及其 SCVs 培养特性和生化试验结果

对野生株及其 SCVs 进行乳糖、山梨醇、

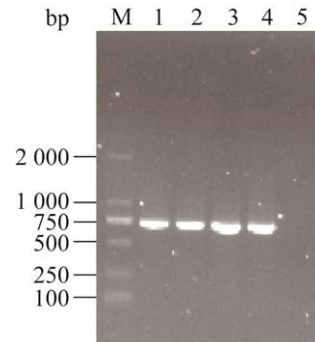


图 1 大肠杆菌及其 SCVs 特异性基因 *phoA* 电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照, 大肠杆菌 ATCC 25922; 2-4: 待检菌株, 依次为 L16-1、L16-1-S 和 L16-1-S-CN; 5: 空白对照

Figure 1 Electrophoresis of specific genes *phoA* in *Escherichia coli* and SCVs. M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control, *Escherichia coli* ATCC 25922; 2-4: Strain to be tested, was L16-1, L16-1-S, and L16-1-S-CN respectively; 5: Blank control.

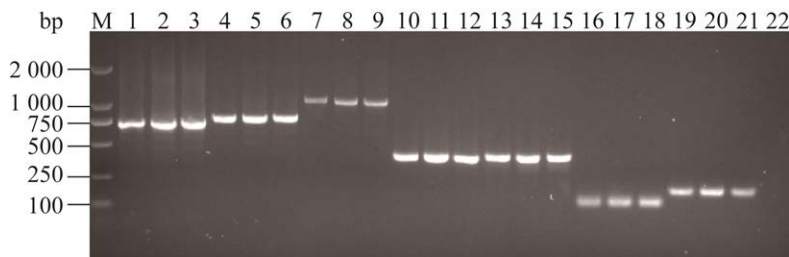


图 2 大肠杆菌(L16-1)及其 SCVs (L16-1-S 和 L16-1-S-CN)的 MLVA 分析 M: DL2000 DNA Marker; 1-3: *rhaD*, 依次为 L16-1、L16-1-S 和 L16-1-S-CN (下同); 4-6: *rsxC*; 7-9: tRNA-Arg; 10-12: *ftsK*; 13-15: *tolA*; 16-18: *hemY*; 19-21: *ytfL*; 22: 空白对照

Figure 2 MLVA analysis of *Escherichia coli* (L16-1) and SCVs (L16-1-S and L16-1-S-CN). M: DL2000 DNA Marker; 1-3: *rhaD*, L16-1, L16-1-S, and L16-1-S-CN, respectively (same below); 4-6: *rsxC*; 7-9: tRNA-Arg; 10-12: *ftsK*; 13-15: *tolA*; 16-18: *hemY*; 19-21: *ytfL*; 22: Blank control.

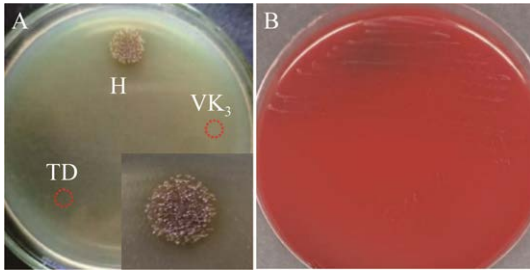


图 3 大肠杆菌 SCVs (L16-1-S)的营养缺陷型检测结果图 A: 在滴加补充血红素(H)的周围出现回复菌落, 而在甲萘醌(VK₃)和胸腺嘧啶脱氧核苷(TD)的周围并未出现回复菌落. B: 在 5% CO₂ 条件下培养大肠 SCVs 菌株, 在血平板上未出现回复菌落

Figure 3 Nutrient-deficient type detection of *Escherichia coli* SCVs (L16-1-S). A: Revertant colonies around the drop of supplemented heme (H), but not around menadione (VK₃) and thymidine (TD). B: Strain of *Escherichia coli* SCVs cultured at 5% CO₂, and no revertant colonies appeared on the blood plate.

甘露醇和葡萄糖发酵试验, 以及触酶试验、硝酸盐还原试验和醋酸盐利用试验。野生株及其 SCVs 均发酵利用葡萄糖和乳糖, 但野生株均利用醋酸盐, 而诱导株均不利用醋酸盐(表 2)。

与野生株相比, L16-1-S 和 L16-1-S-CN 在

血平板和 TSA 培养基上生长缓慢, 呈无色透明的针尖状小菌落, 在麦康凯培养基上呈玫红色的小菌落, 在伊红美蓝培养基上呈带金属光泽的小菌落, 而在 NA 培养基上不生长。相较于野生株, 21-2-S、25-1-S 和 1-12-S 在血平板和 TSA 培养基上的菌落更扁平、更透明, 并未形成小菌落, 在麦康凯培养基上呈玫红色的大菌落, 在伊红美蓝培养基上呈带金属光泽的菌落, 与野生株差异不明显, 而在 NA 培养基上生长缓慢, 呈透明状、圆形扁平小菌落, 与野生株相比差异明显(图 4)。

2.5 大肠杆菌及其 SCVs 生长曲线测定和胞内 ATP 含量测定结果

对野生株及其 SCVs 的生长曲线测定结果表明, 相较于野生株, 诱导株进入对数生长期的时间延后, 对数生长期大幅缩短, 提前进入平衡期, 并且进入平衡期的细菌总 OD₈₃₀ 值也大幅下降(图 5A)。胞内 ATP 的含量检测结果也表明 EC-SCVs 胞内 ATP 含量均低于野生株(图 5B)。

2.6 大肠杆菌及其 SCVs 溶血活性、运动力和生物被膜形成能力检测结果

与野生株相比, 只有血红素依赖型 EC-SCVs

表 2 大肠杆菌及其 SCVs 生化试验

Table 2 Biochemical experiments of *Escherichia coli* and SCVs

菌株	乳糖	山梨醇	甘露醇	葡萄糖	触酶	硝酸盐	醋酸盐
Isolate	Lactose	Sorbitol	Mannitol	Glucose	Catalase test	Nitrate	Acetate
L16-1	+	+	+	+	+	+	+
L16-1-S	+	-	-	+	-	-	-
L16-1-S-CN	+	-	-	+	-	-	-
25-1	+	+	+	+	+	+	+
25-1-S	+	+	+	+	+	+	-
1-12	+	+	+	+	+	+	+
1-12-S	+	+	+	+	+	+	-
21-2	+	+	+	+	+	+	+
21-2-S	+	+	+	+	+	+	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

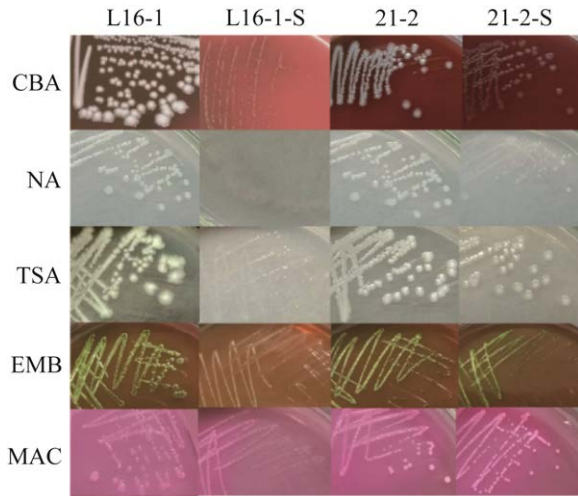


图4 大肠杆菌及其 SCVs 的不同培养特性
Figure 4 Culture characteristics of *Escherichia coli* and SCVs.

的溶血活性增强, 而 3 株未知类型的 EC-SCVs 溶血活性并未增强(图 6A), 但 EC-SCVs 的运动能力均降低(图 6B)。另外, 除 25-1-S 外, 其他 EC-SCVs 的生物被膜形成能力均增强(图 6C)。

2.7 大肠杆菌及其 SCVs 的药物敏感性检测结果

药敏试验结果表明, EC-SCVs 对氨基糖苷类抗生素的耐受性增强, 尤其是血红素依赖型

EC-SCVs 对测试的 4 种氨基糖苷类抗生素的耐受性均增强。另外, 血红素依赖型 EC-SCVs 对复方新诺明的耐受性也增强(表 3)。

3 讨论与结论

目前尚无关于细菌 SCVs 的大规模流行报道, 因其生长缓慢易被生长迅速的野生菌株覆盖, 并且与其他细菌混合感染时易被当作杂菌而忽略。因此, 在实验室通过药物诱导获得 SCVs 菌株成为了解其生物学特性与差异的一种重要方式。目前关于 SCVs 的诱导方法只有零星报道^[17], 而且通常是在液体培养基中添加特定浓度的抗生素进行诱导培养, 然后划线分离纯化, 通过观察菌落特征选择符合要求的菌落再进行传代培养与鉴定。此方法的不足在于: (1) 液体培养基中的抗生素浓度均一, 为恒定值, 而为了选择最适的诱导浓度需要同时设置多个药物浓度进行诱导, 工作量较大; (2) SCVs 在划线分离纯化过程中易被生长迅速的野生型菌株覆盖, 不易得到 SCVs。本课题组在此基础上提出一种新的诱导细菌形成 SCVs 的制备方法^[11], 将其改良为“在固体培养基表面贴上含有

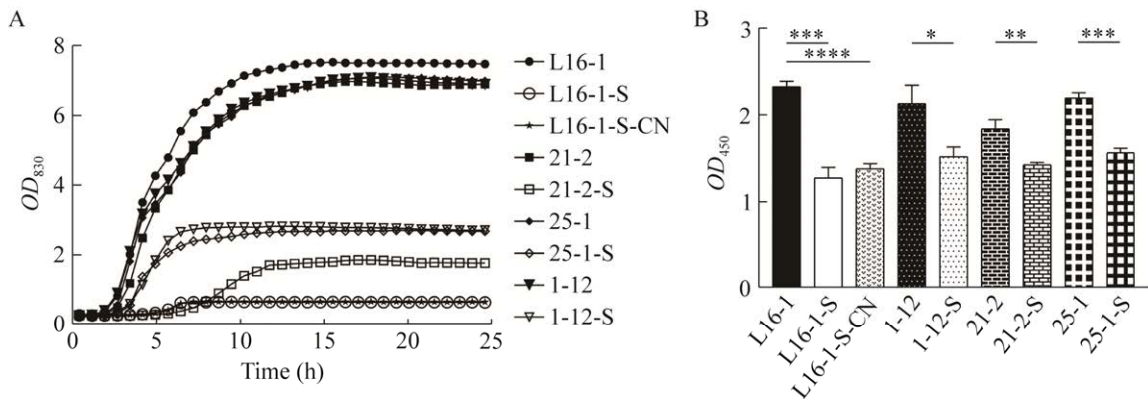


图5 大肠杆菌及其 SCVs 生长曲线测定(A)和胞内 ATP 含量差异(B)

Figure 5 Growth curve determination of *Escherichia coli* and its SCVs (A) and difference in intracellular ATP content (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

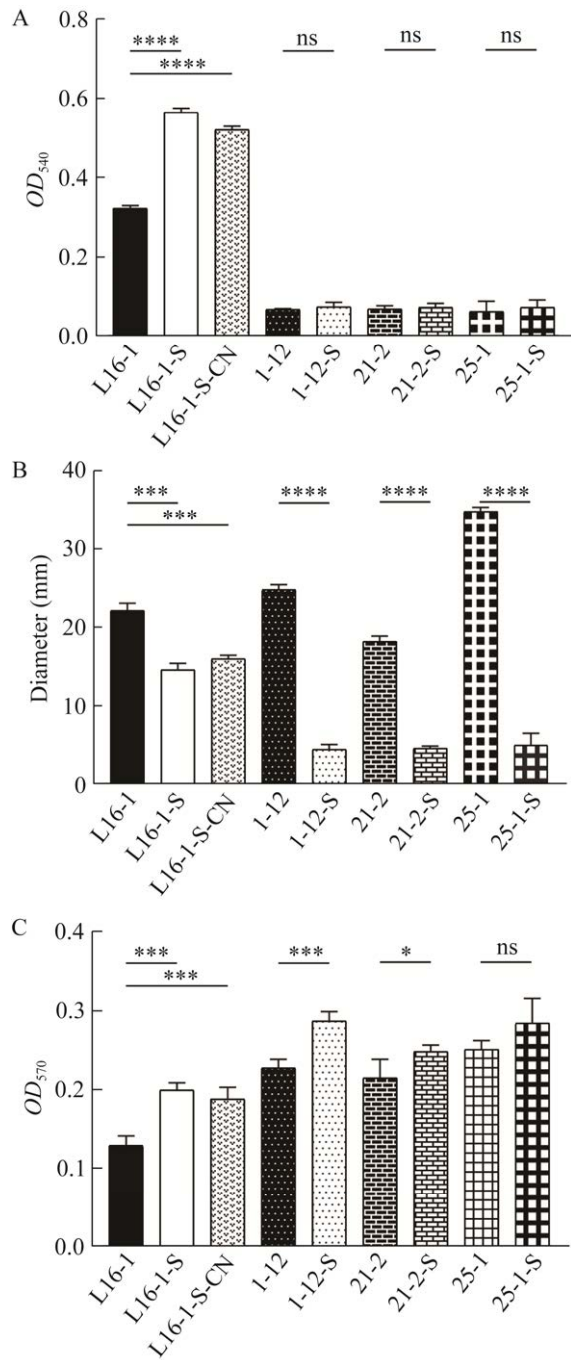


图 6 大肠杆菌及其 SCVs 溶血活性(A)、运动力(B)和生物被膜(C)差异 * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$; **** : $P < 0.0001$; ns: 差异不显著
Figure 6 Content differences of *Escherichia coli* and SCVs in hemolytic activity (A), motility (B), and biofilm (C). * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$; **** : $P < 0.0001$; ns: Not significant.

抗生素的滤纸片,使其形成以滤纸片为中心的连续药物梯度浓度”,可简化细菌 SCVs 诱导和纯化的程序,提高诱导筛选效率。在本研究中使用卡那霉素和庆大霉素对 20 株大肠杆菌进行诱导,得到 2 株血红素依赖型 SCVs 和 3 株未知营养依赖型的 SCVs,并且本课题组前期诱导得到一株血红素依赖型沙门菌^[16],表明此方法具有可行性。但目前尚无细菌 SCVs 产生率的计算模型,因此未能对此方法的诱导效率进行定量比较。

根据依赖物质的不同可将细菌 SCVs 分为血红素依赖型、甲萘醌依赖型、胸腺嘧啶脱氧核苷依赖型和 CO₂ 依赖型,随着研究的深入更多类型的 SCVs 被相继报道,如甘氨酸依赖型 SCVs^[18]、*yijP* (参与辅酶 Q 的合成)、*relA* (调控严谨反应)和 *lipA* 突变(硫辛酸合酶基因)形成的 SCVs,以及多种未知依赖型 SCVs^[10]。这些 SCVs 均具有生长缓慢、代谢降低、ATP 合成不足和电子传递系统受阻等特性,并表现出全局性的变化。在本研究中的血红素依赖型 EC-SCVs 和未知依赖型 EC-SCVs 均表现出生长缓慢、ATP 含量降低、生理生化特性改变等。另外,血红素依赖型 EC-SCVs 具有典型的 SCVs 菌落形态,在血平板上生长缓慢,呈无色透明的针尖状小菌落,并且生化特性发生改变等。但 3 株未知依赖型 EC-SCVs 在血平板上的菌落更扁平、更透明,而在 NA 培养基上生长缓慢、呈透明状、圆形、扁平小菌落,与野生株相比差异明显。在胸腺嘧啶脱氧核苷依赖型 EC-SCVs 中的这种现象被报道过^[19],其特殊的菌落形态可能与细胞壁的不完全分裂有关。这种特殊的非典型 SCVs 菌落形态可能是 EC-SCVs 易被忽视的原因之一。另外,本研究所有类型的 EC-SCVs 均不利用醋酸盐。在大肠杆菌代谢过程中优先分解葡萄糖生成丙酮酸,随后在有氧生长条件

表 3 大肠杆菌及其 SCVs 的药敏试验结果

Table 3 Results of antimicrobial sensitivity tests for *Escherichia coli* and SCVs

分类	抗菌药物	L16-1	L16-1-S	L16-1-S-CN	21-2	21-2-S	1-12	1-12-S	25-1	25-1-S
Class	Antimicrobial									
β-内酰胺类	IPM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
β-lactams	p	R	R	R	S	S	R	R	R	R
	AMP	S	S	S	I	I	R	R	I	I
	KF	I	S	S	I	I	R	R	I	I
四环素类	TGC	S	S	S	S	S	I	I	S	S
Tetracyclines	TE	I	S	S	S	S	R	R	S	S
喹诺酮类	NOR	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fluoroquinolones	ENR	S	S	S	S	S	R	R	S	S
氯霉素类	FFC	S	S	S	S	S	R	R	S	I
Phenicols	C	S	S	S	S	S	R	R	I	S
磺胺类 Sulphonamides	SXT	S	R	R	S	S	R	R	S	S
氨基糖苷类	K	S	R	R	S	R	I	I	S	S
Aminoglycosides	CN	S	R	I	S	R	S	S	S	S
	S	I	R	R	R	R	R	R	I	I
	AK	S	R	R	S	R	I	I	S	S
利福霉素类 Rifamycins	RD	R	R	R	R	R	R	R	R	R
多肽类 Polymyxins	PB	R	I	I	I	S	R	R	R	R

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

S: Susceptibility; I: Intermediate response; R: Resistance.

下被氧化为醋酸盐, 葡萄糖的分解利用与醋酸盐的积累成反比。大肠杆菌也可由醋酸同化代谢系统(*acs-yjcH-actP*)从外界摄取醋酸盐^[20-21]。当葡萄糖分解殆尽后, 醋酸盐进入三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环被分解利用^[20-21]。因此, TCA 循环的抑制会导致醋酸盐的利用障碍, 而醋酸盐利用试验可作为 SCVs 鉴定的表型试验之一。

在电子转移过程中, 需要甲萘醌(作为第一电子受体)和血红素(从甲萘醌接收电子, 并且是细胞色素与过氧化氢酶的重要辅基)^[22]的参与, 相关物质的合成障碍则会抑制电子传递链, 进而导致 ATP 生成减少、细胞色素合成抑制^[23]以及抑制鞭毛蛋白 MotB (动力发生器的重要组成部分, 可将质子穿过细胞质膜的运动与鞭毛马达的旋转结合起来, 使细菌运动^[24])的作用。在本研究中所有 EC-SCVs 的运动力均减弱, 再次说明 SCVs 的能量代谢发生紊乱; 但除血红

素依赖型 EC-SCVs 外, 其他 EC-SCVs 的溶血活性并未增强。血细胞是细菌从外界获得血红素的重要途径之一, 因此推测血红素依赖型 EC-SCVs 为满足自身生存、繁殖与竞争的需求, 通过激活某些调控因子增强溶血能力, 但具体的调控机制仍需进一步研究。与常见的细菌 SCVs 一样, 本研究中的 EC-SCVs 的生物被膜形成能力增强, 这一现象可能与 *sigB* 基因表达上调有关, 并且较强的生物被膜形成能力有助于 SCVs 实现免疫逃避, 从而降低宿主的清除作用^[5,25]。

Lopatkin 等^[26]发现核心代谢基因突变(如中心碳和能量代谢有关基因)可导致细菌抗生素耐药性, 这些基因突变导致基础呼吸降低, 从而降低代谢毒性, 最大限度地降低药物致死率, 并且认为这是一种不同于以往认知(靶向修饰、药物失活和药物外排)的耐药机制。本研究中的 EC-SCVs 也表现出与野生株不同的药物耐受性, 尤其是对氨基糖苷类药物的耐受明显增强,

其可能原因是氨基糖苷类药物进入细菌体内需要借助细胞膜内外的高膜电势能,而细胞膜电势能的改变可影响氨基糖苷类抗生素的摄入。细菌 SCVs 因电子传递功能受阻导致膜内外电位差值较小,减少氨基糖苷类药物的吸收,进而对氨基糖苷类药物的敏感性降低^[3,9]。与不同的是,四环素除可依靠质子动力进入细菌细胞外,还可与 Mg^{2+} 络合后经膜孔蛋白穿过细胞壁进入细菌细胞,并且此过程不需要消耗 ATP,因此对代谢抑制剂不敏感,只要存在完整的细胞膜就可进入菌体^[27-28]。本研究的结果也表明,EC-SCVs 对四环素的耐受性并未增强,反而可能减弱(L16-1-S 和 L16-1-S-CN)。不仅如此,头孢菌素类抗生素(干扰肽聚糖的合成)和多肽类抗生素(作用于脂多糖,增加细胞膜的通透性)均可作用于细菌的细胞壁,破坏细胞壁的功能,而细菌 SCVs 因能量合成受阻导致细胞壁发育不完全^[3,19],进而可能增强这些作用于细胞壁的抗生素对 SCVs 的抑制或杀灭作用。另外,血红素依赖型 EC-SCVs 对磺胺类药物的耐受性增强,磺胺类化合物是对氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid, PABA)的竞争性拮抗剂,而 PABA 是合成叶酸和细菌生长繁殖所必需的化合物^[29]。磺胺类药物可逆地阻断叶酸的合成,从而具有抑菌作用^[29]。可能正是因为 EC-SCVs 代谢障碍、生长缓慢,所需的 PABA 减少,从而对磺胺类药物的耐受性增强,但其机制还有待深入研究。目前这种与能量代谢相关的药物耐受机制研究正成为热点,也是细菌耐药问题解决的难点,同时也为抑菌药物的研发与应用提供了新的思路。

本研究通过氨基糖苷类抗生素诱导大肠杆菌形成 SCVs,并对其与野生株进行生物学特性比较分析,结果表明 EC-SCVs 表现出生长抑制、代谢缓慢、ATP 含量减少以及运动力降低、生物被膜增强和药物耐受性增强等特征,可为国内 EC-SCVs 的相关研究提供基础数据。

REFERENCES

- [1] KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 123-140.
- [2] HAMMERUM AM, HEUER OE. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 48(7): 916-921.
- [3] PROCTOR RA, von EIFF C, KAHL BC, BECKER K, McNAMARA P, HERRMANN M, PETERS G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(4): 295-305.
- [4] WATANABE Y, OIKAWA N, HARIU M, SEKI M. Evaluation of agar culture plates to efficiently identify small colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 1743-1748.
- [5] KAHL BC, BECKER K, LÖFFLER B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2016, 29(2): 401-427.
- [6] PROCTOR RA, KRIEGESKORTE A, KAHL BC, BECKER K, LÖFFLER B, PETERS G. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014, 4: 99.
- [7] ALKASIR R, LIU XQ, ZAHRA M, FERRERI M, SU JL, HAN B. Characteristics of *Staphylococcus aureus* small colony variant and its parent strain isolated from chronic mastitis at a dairy farm in Beijing, China[J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(2): 138-145.
- [8] BUI LMG, CONLON BP, KIDD SP. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*[J]. Essays in Biochemistry, 2017, 61(1): 71-79.
- [9] PARHAM S, RICHARD AP. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(2): 54-58.
- [10] 高硕, 周万青. 大肠埃希菌小菌落变异型的特征及临床意义研究进展[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(4): 297-300. GAO S, ZHOU WQ. Research progress on characteristics and clinical significance of *Escherichia coli* microcolony variant[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2019, 37(4): 297-300 (in Chinese).
- [11] 陈伟, 吴自豪, 池昊明, 蔡依龙, 吴静. 诱导细菌形成小菌落变异体的制备方法: CN114107162A[P]. 2022-03-01. CHEN W, WU ZH, CHI HM, CAI YL, WU J.

- Preparation method for inducing bacteria to form small colony variants: CN114107162A[P]. 2022-03-01 (in Chinese).
- [12] HU QH, TU J, HAN XG, ZHU YY, DING C, YU SQ. Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteric* simultaneously from ducks[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(1): 64-69.
- [13] CAMÉLÉNA F, BIRGY A, SMAIL Y, COURROUX C, MARIANI-KURKDJIAN P, Le HELLO S, BONACORSI S, BIDET P. Rapid and simple universal *Escherichia coli* genotyping method based on multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis using single-tube multiplex PCR and standard gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(6): e02812-18.
- [14] DRESSAIRE C, MOREIRA RN, BARAHONA S, ALVES de MATOS AP, ARRAIANO CM. BofA is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development[J]. mBio, 2015, 6(1): e02352-e02314.
- [15] FANG B, LIU BH, SUN BL. Transcriptional regulation of virulence factors Hla and phenol-soluble modulins α by AraC-type regulator Rbf in *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2020, 310(5): 151436.
- [16] 鲁壮壮, 吴自豪, 池昊明, 龚洁, 陈伟. 新疆阿克苏地区一株羊源沙门菌及其小菌落变异株的生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3467-3478.
LU ZZ, WU ZH, CHI HM, GONG J, CHEN W. Biological characteristics of a sheep-derived strain of *Salmonella* and its small colony variant in Aksu, Xinjiang[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3467-3478 (in Chinese).
- [17] ATALLA H, GYLES C, JACOB CL, MOISAN H, MALOUIN F, MALLARD B. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2008, 5(6): 785-799.
- [18] LIU JL, SHEN Z, TANG J, HUANG Q, JIAN Y, LIU Y, WANG YN, MA XW, LIU Q, HE L, LI M. Extracellular DNA released by glycine-auxotrophic *Staphylococcus epidermidis* small colony variant facilitates catheter-related infections[J]. Communications Biology, 2021, 4: 904.
- [19] NEGISHI T, MATSUMOTO T, HORIUCHI K, KASUGA E, NATORI T, MATSUOKA M, OGIWARA N, SUGANO M, UEHARA T, NAGANO N, HONDA T. Characterization of clinically isolated thymidine-dependent small-colony variants of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(1): 33-39.
- [20] SOMERVILLE GA, CHAUSSEE MS, MORGAN CI, FITZGERALD JR, DORWARD DW, REITZER LJ, MUSSER JM. *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(11): 6373-6382.
- [21] ZHUGE XK, SUN Y, JIANG M, WANG JF, TANG F, XUE F, REN JL, ZHU WY, DAI JJ. Acetate metabolic requirement of avian pathogenic *Escherichia coli* promotes its intracellular proliferation within macrophage[J]. Veterinary Research, 2019, 50(1): 31-48.
- [22] COLLINS MD, JONES D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication[J]. Microbiological Reviews, 1981, 45(2): 316-354.
- [23] MCNAMARA PJ, PROCTOR RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000, 14(2): 117-122.
- [24] CHUN SY, PARKINSON JS. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein[J]. Science, 1988, 239(4837): 276-278.
- [25] CAMPOCCIA D, MIRZAEI R, MONTANARO L, ARCIOLA CR. Hijacking of immune defences by biofilms: a multifront strategy[J]. Biofouling, 2019, 35(10): 1055-1074.
- [26] LOPATKIN AJ, BENING SC, MANSON AL, STOKES JM, KOHANSKI MA, BADRAN AH, EARL AM, CHENEY NJ, YANG JH, COLLINS JJ. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance[J]. Science, 2021, 371(6531): eaba0862.
- [27] McMURRY L, LEVY SB. Two transport systems for tetracycline in sensitive *Escherichia coli*: critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1978, 14(2): 201-209.
- [28] McMURRY LM, CULLINANE JC, PETRUCCI RE Jr, LEVY SB. Active uptake of tetracycline by membrane vesicles from susceptible *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1981, 20(3): 307-313.
- [29] TACIC A, NIKOLIC V, NIKOLIC L, SAVIC I. Antimicrobial sulfonamide drugs[J]. Advanced Technologies, 2017, 6(1): 58-71.