

九孔鲍养殖水体及其肠道不同菌群抗药性研究*

蔡俊鹏^{2**} 周毅频¹ 蔡创华¹

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)¹ (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)²

摘要: 为更好地防治鲍鱼病害的发生和流行,对分离自广东汕尾健康鲍鱼养殖场九孔鲍养殖环境及其肠道中不同细菌菌群的耐药性进行了研究。结果表明,四环素、青霉素 G、卡那霉素、丁胺卡那霉素和新生霉素均对绝大多数异养菌和弧菌菌株都不敏感或无作用;相反,氟哌酸、红霉素、氯霉素以及环丙沙星等则均对它们比较敏感;复方新诺明、链霉素和多粘霉素 B 对弧菌菌株均有作用,而且多粘霉素 B 也对水体中的异养菌群相当有效。

关键词: 九孔鲍肠道, 养殖水体, 异养细菌, 弧菌, 药敏试验, 抗药性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0048-05

Studies on Antibiotic Resistance of Different Groups of Marine Bacteria Isolated from Abalone (*Haliotis diversicolor*) Farming Waters And Their Digestion Guts

CAI Jun-Peng^{2**} ZHOU Yi-Pin¹ CAI Chuang-Hua¹

(Institute of South China Oceanography, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)¹

(College of Food Science and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)²

Abstract: For the prevention of potential outbreaks of abalone diseases, antibiotic susceptibility tests were performed on the bacteria isolated from both abalone farming waters and their digestion guts. Results showed that while majority of heterotrophic bacteria and vibrio isolates displayed resistance to tetracycline, Penicillin G, Kanamycin, Amikacin and Neomycin, they nevertheless exhibited relatively high sensitivities toward Norfloxacin, Erythromycin, Chloramphenicol and Ciprofloxacin. All vibrio isolates from both the farming waters and abalone digestion guts could be effectively inhibited by SMZ + TMP, Streptomycin and Polymyxin B, whereas heterotrophic bacteria from abalone farming waters showed no resistance at all toward the latter. This study also indicated that compared to vibrio isolates, heterotrophic bacteria isolates possessed a wider spectrum of antibiotic resistances.

Key words: Abalone (*Haliotis diversicolor*) digestion gut, Farming waters, Heterotrophic bacteria, *Vibrio*, Antibiotic susceptibility test, Antibiotic resistance

随着鲍鱼养殖业集约化程度的不断提高,各种鲍鱼病害的发生也越来越频繁。2000年初,广东省汕尾市遭受病害袭击,11家鲍鱼养殖场有9个场发病^[1],给鲍鱼养殖业造成了巨大损失,使鲍鱼病的防治成为目前急需解决的问题。鲍鱼的很多病害如脓疱病、脓毒败血病等都是由细菌引起,尤其是弧菌^[2-8],而针对它们的防治,目前仍依赖于化学药物。由于大量抗生素等化学药物的长期过量使用,导致细菌耐药性的日益严重^[9,10]。尽管如此,有关鲍鱼养殖水体及其肠道中正常微生物菌群,包括异养细菌和弧菌,对各种抗生素抗药性的研究报道极少^[11],故此,为了解鲍鱼养殖水体及其肠道中

* 国家自然科学基金基多资助项目 (No. 30070591, No. 40176036)

Projects Granted by Chinese Natural Science Fund (No. 30070591, No. 40176036)

** 联系人 Tel: 020-87538286, E-mail: fehjpc@scut.edu.cn

收稿日期: 2004-03-02, 修回日期: 2004-05-30

微生物菌群对常用抗生素药物的耐药性,为帮助鲍鱼养殖厂家安全使用各种抗菌药物,我们特对所分离到的鲍鱼养殖水体及其肠道中的微生物菌群对抗生素的敏感性进行了测定。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品采集

取样点:2002年3月广东省汕尾健生鲍鱼场。

样品采集:水样直接用灭菌三角瓶从养殖池采集水样,将水样进行适当梯度稀释。鲍鱼采自同一水池9月龄小鲍鱼,鲍鱼消化道取样时,先用无菌水将鲍鱼冲洗干净,用手术刀剖开鲍鱼腹腔,用镊子小心将鲍鱼肠胃取出,称重后放入研钵中,先加入1 mL稀释液,研磨10 min后再加入9 mL稀释液摇匀,继续做适度稀释。

1.2 培养基

异养细菌培养基用2216E佐贝尔海洋细菌培养基;蛋白胨5.0 g,酵母膏1 g,磷酸高铁0.01 g,琼脂粉15 g,陈海水1,000 mL,pH7.6~7.8。弧菌用TCBS培养基,为广东环凯微生物科技公司产品。

1.3 细菌分离

取不同稀释度水样0.1 mL加入到制好的平板培养基上(9 cm培养皿),用三角玻棒涂抹均匀,每个稀释度做3个平行样,连续做3个不同稀释度,置25℃条件下培养(异养细菌培养7 d,弧菌培养2 d后取出观察菌落,并根据菌落的不同形态特征挑出代表性菌株,接到斜面培养基上作种群鉴定)。

1.4 菌株鉴定

菌株纯化后,根据菌株培养特征,细胞形态,革兰氏染色和氧化酶反应选择法国梅里埃公司API鉴定条,检测生理生化反应^[12],根据结果应用API LAB软件并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行检索鉴定(结果另文发表)。

1.5 药敏试验

细菌药物敏感试验采用纸片法^[13,14],药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司,根据天和微生物试剂有限公司提供的判断标准进行结果判定。

2 结果与讨论

由于细菌在养殖水体中的位置非常重要,保持正常菌群的微生态平衡,防止致病菌的异常增殖,是鲍鱼病防治的基础。研究了解不同来源不同种类的细菌菌群对药物的敏感性、耐药性,合理采用抗菌素以防治鲍鱼病害,是非常必要。我们以纸片法测定了16种常用抗菌素(取各大类,抗菌素种类如表1)测定抗菌素对不同来源、不同类群菌株的抑菌作用,为病害的防治提供科学依据。

表1 本实验所用抗菌素种类

抗生素种类	每片剂量
链霉素 (Streptomycin)	10 μ g
四环素 (Tetracycline)	30 μ g
新霉素 (Neomycin)	30 μ g
氨苄青霉素 (Ampicillin)	10 μ g

续表 1

新生霉素 (Novobiocin)	30 μ g
红霉素 (Erythromycin)	15 μ g
多粘霉素 B (Polymyxin B)	300 μ g
庆大霉素 (Gentamycin)	10 μ g
丁胺卡那霉素 (Amikacin)	30 μ g
复方新诺明 (SMZ + TMP)	1.25 μ g/23.75 μ g
氟哌酸 (Norfloxacin)	10 μ g
卡那霉素 (Kanamycin)	30 μ g
先锋霉素 V (Cephalothin V)	30 μ g
青霉素 G (Penicillin G)	10IU
氯霉素 (Chloramphenicol)	30 μ g
环丙沙星 (Ciprofloxacin)	5 μ g

2.1 鲍鱼养殖水体异养细菌菌群的药敏试验

水体中 8 株异养细菌对 16 种抗菌素敏感性试验结果表明, 除 *Moraxella* spp. 尚未对所用药物产生抗药性之外, 其余所有菌株均已对所试 16 种药物的一或多种药物产生了抗性。对抗生素最具广谱抗药性的是 *Pasteurella* spp. 和 *Aeromonas hydrophila*, 共对 16 种中的 8 种抗生素产生了抗性, 包括对新生霉素、四环素、氨苄青霉素和青霉素 G 等, 而且 *Pasteurella* sp. 也是惟一对氯霉素产生抗性的异养细菌; 其次是 *Klebsiella oxtoca* 和 *Pseudomonas cepacia*, 分别对 7 种抗菌素有抗性。

由于针对多粘霉素 B 和氟哌酸的耐药性菌株尚未出现, 因此在鲍鱼养殖中, 针对水体中的异养细菌的首选抗生素应是它们; 而其余所试 14 种抗菌素, 包括新霉素、氯霉素、红霉素、庆大霉素和环丙沙星等, 均已在不同程度上出现了不敏感的异养菌株, 尤其是四环素, 在所研究的来自水体的 8 株异养菌中, 已有 7 株对它有耐药性, 也即约有 88% 的异养菌株对它有抗性。因此对于这些药物, 应该特别慎用。

2.2 鲍鱼养殖水体弧菌菌群的药敏试验

水体中 6 株弧菌对 16 种抗菌素敏感性试验结果表明, 除了复方新诺明、链霉素和多粘霉素对所试 6 株弧菌均有效外, 其余 13 种抗生素已或多或少失去了其应有的药效。大约有 17% 的弧菌菌株 (1/6 株) 已对氟哌酸、环丙沙星和氯霉素有抗性, 33% 的弧菌菌株 (2/6 株) 也对先锋霉素 V 和红霉素产生了耐药性, 而对四环素有耐药性的弧菌菌株, 则高达 100% (6/6 株), 也即它对所有所试的弧菌均无效果。

就不同种类弧菌对不同抗生素的耐药谱而言, 拥有最宽抗药谱 (耐药性) 的种类为 *V. parahaemolyticus*, 它对 69% 的所试药物 (11/16 种) 有耐药性, 仅对链霉素和氯霉素高度敏感, 对多粘霉素和红霉素中度敏感; 次之则为 *V. vulnificus*, 3 株菌株分别对 6、7、9 种药物有耐药性, 平均对 50% 的药物不敏感; 接下来则是 *V. cholerae* 和 *V. mimicus*, 它们分别对 6 种 (38%) 和 4 种 (25%) 药物有抗药性。

2.3 鲍鱼消化道异养细菌菌群的药敏试验

鲍鱼消化道 7 株异养细菌对 16 种抗菌素敏感性试验结果表明, 除针对红霉素的耐药性尚未产生外, 所有其它 15 种所试药物均不同程度地已有耐药菌株的出现。耐药菌株出现最多的为丁胺卡那霉素, 共有 7 株菌株有抗药性, 占所研究总菌株的 100%; 次之为四环素和卡那霉素, 各有 5 株菌株有抗药性, 占所研究总菌株的 70%。

就不同种类异养菌对不同抗生素的耐药谱而言,拥有最宽抗药谱的种类为 *Enterobacter salazarikii*,它对56%的所试药物(9/16种)有耐药性;次之则为 *Flavobacterium meningosepticus*,它对50%所试药物(8/16种)不敏感,同时也是惟一对氯霉素产生抗性的鲍鱼肠道异养细菌;对最少数种类的药物有抗药性的是 *Aeromonas salmonicida*,它仅对3种(19%)药物有抗药性,即丁胺卡那霉素、四环素和复方新诺明。

2.4 鲍鱼消化道弧菌群的药敏试验

7种鲍鱼消化道弧菌对16种抗菌素敏感性试验结果表明,除针对链霉素、环丙沙星、复方新诺明和多粘霉素的耐药性菌株尚未产生外,所有其它12种所试药物均或多或少已有抗药菌株的出现。抗药菌株出现最多的为丁胺卡那霉素和四环素,共有7株菌株有抗药性,占所研究总菌株的100%;次之为青霉素G和新生霉素,各有6株菌株有抗药性,占所研究总菌株的87%;接下来是卡那霉素、庆大霉素和氨苄青霉素,各有5株菌株有抗药性(70%);其余药物,包括红霉素、氯霉素、先锋霉素等,各有1至2株耐药株的出现。

就不同种类弧菌对不同抗生素的耐药谱而言,拥有最宽耐药谱的种类为 *V. alginolyticus*,它对62.5%的所试药物(10/16种)有耐药性;拥有最窄耐药谱的则是 *V. hol-lisae*,它仅对2种(12%)药物有抗药性,即丁胺卡那霉素和四环素。

2.5 不同来源异养细菌群与弧菌群药敏试验的比较

比较养殖水体与鲍鱼肠道中的异养细菌对抗生素的敏感性,可以发现,水体和/或肠道中的异养菌群已对所有16种抗生素都不同程度产生了耐药性:耐药性出现频率较高,也即有较多菌株表现出抗药性的药物有四环素、卡那霉素、青霉素G、新生霉素和丁胺卡那霉素;耐药性出现频率较低,也即较少菌株表现出抗药性的药物有氟哌酸、红霉素、氯霉素、新霉素、链霉素以及环丙沙星;其它药物的耐药菌株的出现频率介于它们之间。这些发现提示,在单纯考虑如何杀灭致病性异养细菌如 *Aeromonas* 等时,氟哌酸、红霉素、氯霉素、新霉素、链霉素以及环丙沙星等应该是首选,而且最好是联合用药,否则有可能会更快地使更多的菌株产生抗药性。

比较养殖水体与鲍鱼肠道中的弧菌对抗生素的敏感性,结果表明,所有弧菌菌株尚未对链霉素、复方新诺明和多粘霉素B产生抗性,但已对青霉素G、卡那霉素、四环素、丁胺卡那霉素和新生霉素产生了较为广泛的抗药性。针对氟哌酸、红霉素、氯霉素、先锋霉素V以及环丙沙星的弧菌耐药菌株,虽然为数尚少(0~16%的种群),但必需引起重视,否则将导致更多细菌对这些药物的不敏感。

四环素对绝大多数菌株(无论是异养菌或弧菌)都不敏感或无作用,这和宋庆云等^[4]对从扇贝养殖环境及其体内分离菌株药敏试验结果基本一致。除此以外,青霉素G、卡那霉素、丁胺卡那霉素和新生霉素也对绝大多数菌株(无论是异养菌或弧菌)不敏感或无作用。这其中的共性,将有待我们的进一步研究。

就产生抗药性的能力来说,异养细菌似乎具有略为宽广的抗药谱:肠道异养细菌对15种药物有抗性,水体异养细菌也对14种药物有抗性;与此相反,鲍鱼肠道中的弧菌对12种药物有抗性,而养殖水体中的弧菌则对13种药物有抗性。

3 结论

研究表明,无论是异养菌还是弧菌,无论是来自养殖水体还是鲍鱼肠道,四

环素、青霉素 G、卡那霉素、丁胺卡那霉素和新生霉素均对绝大多数菌株都不敏感或无作用；相反，氟哌酸、红霉素、氯霉素以及环丙沙星等则均对它们比较敏感；复方新诺明、链霉素和多粘霉素 B 对所研究的弧菌菌株均有作用，而且多粘霉素 B 也对水体中的异养菌群相当有效。

以上结果意味着，在同时杀灭异养细菌和弧菌时，氟哌酸、红霉素、氯霉素、多粘霉素 B 以及环丙沙星应该是首选；如果只需杀灭弧菌，那么复方新诺明和链霉素将是可选的药物，同时也在很大程度上杀灭异养细菌。

本研究也显示，异养细菌与弧菌相比，似乎具有略为宽广的抗药谱。

药敏试验结果表明，在防治鲍鱼病害时，要注意合理选用抗菌素，不滥用药物，以达到药到病除的目的，否则不但不能杀灭病源菌，反而会因杀灭其它无害细菌，进而减少空间和/或营养上的竞争，给病原菌的繁殖创造更好的条件，从而产生相反的效果。

致谢 感谢广东省汕尾健生鲍鱼场对本工作的大力支持，没有他们的帮助，本项研究是不可能出色完成的。

参考文献

- [1] 黄汉泉, 冯波. 水产科技, 2000, 2: 3-4.
- [2] 张朝霞, 王军, 张蕉南, 等. 台湾海峡, 2001, 20 (2): 193-200.
- [3] Elston R. J Fish Dis, 1983, 6 (2): 111-128.
- [4] Anguiano-Belurón C, Searcy-Bernal R, Lizárraga-Partida M L. Dis Aquatic Organisms, 1998, 33 (2): 119-122.
- [5] 聂丽平, 刘金屏, 李太武, 等. 中国微生物学杂志, 1995, 7 (1): 33-36.
- [6] 马健民, 王琦, 马福恒, 等. 水产学报, 1996, 20 (4): 332-336.
- [7] 马健民, 肖燕. 中国微生态学杂志, 1997, 9 (5): 24-26.
- [8] 徐晓津. 齐鲁渔业, 2000, 17 (2): 38-39.
- [9] 李军仪, 陈志胜, 杨大伟, 等. 水产科技, 1999, 4: 1-4.
- [10] 李太武, 苏秀容, 丁进明. 辽宁师范大学学报, 1999, 22 (3): 231-235.
- [11] 启华, 黄文芳. 华南师范大学学报, 2002, 1: 113-116.
- [12] 倪纯治. 海洋环境科学, 1990, 9 (4): 46-49.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 宋庆云, 罗挽涛, 王文兴, 等. 黄渤海海洋, 1997, 15 (3): 26-30.