

鲍消化道及其养殖水体异养菌的耐药性研究

孙永婵^{1,2}, 王瑞旋², 赵曼曼², 曹超², 鲁义善¹, 姚托², 王江勇²

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东省水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 采用纸片扩散法对分离自福建省皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 消化道及其养殖水体中的 284 株异养细菌 (其中消化道菌 131 株, 水体菌 153 株) 进行药物敏感测试, 以期了解其耐药性概况。结果显示, 皱纹盘鲍消化道与养殖水体异养菌对多种抗菌药物的耐药率差异不明显, 大部分菌株对青霉素、卡那霉素、庆大霉素、利福平产生耐药性, 耐药率最高达 83.95%, 而对诺氟沙星、恩诺沙星、氯霉素耐药率较低, 受试的水体异养菌对诺氟沙星耐药率为 0; 不同来源菌株的多重耐药 (multiple antibiotic resistance, MAR) 现象普遍, 消化道及其养殖水体异养菌的多重耐药率均值分别为 59.15% 和 51.31%。该研究同时发现相同分离源的菌株对青霉素、卡那霉素、庆大霉素和利福平的耐药率呈现一定的季节波动规律, 消化道异养菌于 9 月耐药率最低, 而水体异养菌耐药率在 6 月最低。结果表明, 皱纹盘鲍消化道及水体异养菌的多重耐药率较高, 耐药状况较严重。

关键词: 皱纹盘鲍; 异养细菌; 抗菌药物; 耐药率; 多重耐药性

中图分类号: S 948

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2017)03-0058-08

Study of antibiotic-resistance of heterotrophic bacteria from intestines of abalone (*Haliotis discus hannai*) and farming water

SUN Yongchan^{1,2}, WANG Ruixuan², ZHAO Manman², CAO Chao²,
LU Yishan¹, YAO Tuo², WANG Jiangyong²

(1. Guangdong Provincial Key Lab. of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Guangdong Key Lab. of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Lab. of Fishery Ecology and Environment; Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A total of 284 strains (153 were isolated from intestines and 131 were isolated from farming water) were tested by Kirby-bauer diffusion method to study the resistance of *Haliotis discus hannai* in Fujian Province. Results show that many strains resisted penicillin G, kanamycin, gentamicin and rifampin. The resistant rates were up to 83.59%; the resistant rates to norfloxacin, chloramphenicol and enrofloxacin were all relatively low, and resistant rate to norfloxacin was the lowest in farming water. Thus, there is no different resistance between heterotrophic bacteria from intestines and farming water. Multiple antibiotic resistance (MAR) was widespread in different sources and the average MARs were 59.15% and 51.31% in intestines and farming water. The resistant rates to penicillin G, kanamycin, gentamicin and rifampin from intestines were the lowest in September and those from farming water were the

收稿日期: 2016-05-20; 修回日期: 2016-08-11

资助项目: 国家自然科学基金项目(41206118); 广东省级鱼病防治专项资金(2014-585); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201301F04); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2014TS29, 2016TS09)

作者简介: 孙永婵(1989-), 女, 硕士研究生, 从事贝类病害细菌耐药性研究。E-mail: sunyongchan@163.com

通信作者: 王江勇(1971-), 男, 博士, 研究员, 从事贝类病害研究。E-mail: wjy104@163.com

lowest in June.

Key words: *Halotis discus hannai*; heterotrophic bacteria; antimicrobial agents; resistance rate; multiple antibiotic resistance rate

鲍隶属于软体动物门、腹足纲、前鲍亚纲、原始腹足目、鲍科、鲍属。中国海域辽阔, 适合多种鲍生长, 皱纹盘鲍(*Halotis discus hannai*)是中国北方的主要养殖品种, 主要分布于山东半岛及辽东半岛海域, 随着养殖技术的发展, 福建成功引入皱纹盘鲍, 目前已成为福建的主要养殖品种^[1]。鲍养殖初期与其他水生动物一样, 长势良好、病害发生少、发病率与死亡率低, 随着鲍养殖业迅速发展, 高密度养殖日益增多、养殖布局不合理、养殖环境恶化等是养殖过程中出现的新问题, 导致了鲍病害的暴发与流行, 鲍养殖产业损失惨重, 严重制约鲍产业的进一步发展^[2]。根据已有报道, 鲍主要的病原生物包括病毒、细菌、寄生虫及其他病原微生物等, 而与鲍病害有关的病原多为细菌, 且弧菌占据主导地位^[3], 不同的病原菌可引起鲍发生相似的病症, 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)^[4]、亮弧菌-II(*Vibrio splendidus*-II)^[5]等可引起鲍溃烂病, 使鲍足部肌肉溃烂; 鲍脓疱病可由溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[6]、河流弧菌-II(*V. fluvialis*-II)^[7]或河流弧菌(*V. fluvialis*)^[8]导致, 引起腹足收缩、表面出现多个大小不等脓疱等症状。针对细菌性疾病, 主要是依赖抗菌药治疗, 由于抗菌药的大量使用、误用、滥用等让养殖水体的病原菌处于胁迫的环境下, 促进病原菌产生耐药性, 甚至产生多重耐药性, 病原菌耐药性的产生最终会导致抗菌药物用量增加, 最终无药可用, 造成恶性循环^[9]。

水产动物细菌性疾病是阻碍水产养殖业发展的重要因素, 耐药菌的出现使得疾病治疗效果不佳甚至失效。早在1945年磺胺类药物成功治疗鳟鱼疔疮病, 自那以后, 多种抗菌药相继应用于鱼类疾病防治, 例如土霉素、氯霉素、卡那霉素等^[10]。然而抗菌药应用于水产养殖业短短的十多年间, 发现使日本大麻哈鱼(*Oncorhynchus*)发生大规模流行性感染的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)对磺胺药和氯霉素均有抗性^[11]。李爱华^[12]通过统计1972年~1984年出现的鱼类病原菌耐药性发现不同病原菌中均有一定程度的耐药株。说明细菌是在不断适应不良环境, 细菌耐药性随着适应过程不断演变。水产养殖环境病原

菌耐药性已日趋严重(表1), 大部分都是多重耐药菌。已有研究证实, 抗菌药使用历史越久, 可出现对多种药物具抗性的现象, 也就是出现多重耐药菌^[13]。

水产养殖上对细菌耐药性的研究主要集中在鱼、虾类等宿主, 而对贝类细菌的耐药性研究鲜有报道, 因此选取福建省东山县2种不同养殖模式的皱纹盘鲍作为研究对象, 研究其在5月~10月体内外异养菌耐药率, 了解不同时期耐药率变化及养殖过程中抗生素的使用情况, 为鲍细菌性疾病预防与治疗提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

采样时间为2013年5月~10月。采样地点为福建省漳州市东山县(117°27'19" E, 23°39'46" N)。分别取2种不同养殖模式的皱纹盘鲍及其养殖水体, 工厂化养殖鲍及其养殖水体编号为XBB、XBS; 外海区养殖鲍及其养殖水体编号为DSB、DSS。

采样方法为: 1) 鲍消化道细菌的分离。每月的22~25日到2个鲍养殖场1#养殖池随机选取10~20只鲍, 用灭菌生理盐水清洁鲍体表, 取5~10只鲍的消化道组织进行混合, 称取0.3~0.5 g组织置于玻璃匀浆器中, 放入1 mL灭菌生理盐水人工研磨成匀浆状后, 灭菌生理盐水稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 3个梯度, 分别吸取各稀释梯度100 μ L于TCBS(thiosulfate citrate bile saccharose)平板进行涂布, 每个梯度3个平行, 涂布后的平板带回实验室置于28℃恒温培养箱中培养72 h后, 挑取形态各异的菌落, 纯化后保种用作后期药敏试验。

2) 养殖环境细菌的分离。用灭菌海水将养殖水体稀释成 10^0 、 10^{-1} 和 10^{-2} 梯度, 每个梯度3个平行, 分别吸取各稀释梯度100 μ L于TCBS平板进行涂布, 涂布后的平板带回实验室置于28℃恒温培养箱中培养72 h后, 挑取形态各异的菌落, 纯化后保种用作后期药敏试验。

3) 质控菌株。大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923), 实验室保存。

表 1 水产细菌耐药性研究概况

Tab. 1 Antibiotic drug resistance of aquatic bacteria

菌株种类 bacteria species	菌株来源 source of bacteria	耐药种类 resistance type	参考文献 Reference
13 株弧菌 6 株水体菌 (<i>Vibrio</i>)	鲍养殖水体 鲍消化道	青霉素 G、四环素、卡那霉素、丁胺卡那霉素, 耐药谱为氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素占 79%, 水体菌最多可耐 12 种药物	[14]
溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	鲍病灶	青霉素 G、头孢类药物、复方新诺明, 四环素完全不耐药	[6]
河流弧菌-II (<i>Vibrio fluvialis</i> -II)	皱纹盘鲍	青霉素、氨苄青霉素、氯霉素、复方新诺明	[15]
弧菌属 (<i>Vibrio</i> spp.)	鲍养殖水体 鲍消化道	四环素、呋喃唑酮、卡那霉素、庆大霉素、	[16]
荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	皱纹盘鲍 幼鲍	磺胺类、氨苄青霉素、青霉素、庆大霉素、红霉素	[4]
哈维弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	方斑东风螺 (<i>Babylonia areolata</i>)	青霉素	[17]
41 株优势弧菌 (<i>Vibrio</i>)	军曹鱼与养殖水体 (<i>Rachycentron canadum</i>)	氨苄青霉素、青霉素耐药率较高 四重耐药率达 9.8%, 主要是对氨苄青霉素、青霉素 G、复方新诺明、诺氟沙星、多粘菌素耐药	[18]
溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	患病石斑鱼及养殖水体	洁霉素、乙酰螺旋霉素、万古霉素、氯洁霉素、制霉菌素完全耐药	[19]
哈维弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	杂色鲍 (<i>Hallotis diversicolor</i>)	复方新诺明	[20]
假替单胞菌 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	患病石斑鱼	青霉素、卡那霉素、万古霉素等 18 种药物耐药	[21]
33 株溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	上海临港 海水	四环素、氨苄青霉素、羧苄青霉素, 所有分离株均为多重耐药	[22]
184 株弧菌 (<i>Vibrio</i>)	上海、江苏、海南等地 海水养殖区	新生霉素、复方新诺明、恩诺沙星、利福平	[23]
49 株嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	中国各地的淡水养殖区	氨苄青霉素、头孢氨苄	[24]

1.2 抗菌药种类

选用 10 种抗菌药(购自杭州微生物试剂有限公司), 红霉素(EM, $15 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、青霉素 G(P, $10 \text{ U} \cdot \text{片}^{-1}$)、卡那霉素(KNA, $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、氯霉素(CHL, $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、庆大霉素(GM, $10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、复方新诺明(TMP/SMZ, $23.75/1.25 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、利福平(RIF, $5 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、诺氟沙星(NOR, $10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、恩诺沙星(ENR, $5 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、四环素(TE, $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)。

1.3 药敏试验纸片扩散法(Kirby-Bauer 扩散法, 简称 K-B 法)

参照美国临床和实验室标准协会的方法^[25]进行, 以 1 mL 生理盐水洗脱斜面上的菌苔, 对照麦氏比浊管调整菌悬液浓度约为 $1.5 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (麦氏比浊法), 吸取 100 μL 菌液于含 2% 氯化钠的 MH(Mueller-Hinton)平板, 涂布均匀放置 5~10 min, 贴上抗菌药纸片(每个纸片必须压下以确保与琼脂表面完全接触, 每个培养基最多放置 5 张纸

片), 倒置于 28 ℃ 生化培养箱中培养 24 ~ 48 h 后, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。根据抑菌圈直径大小^[25], 对照相关参照表分为敏感(S)、中介(I)、耐药(R)。

1.4 统计方法

耐药率计算为: 耐药率 = (耐药菌株数/受试菌总数) × 100%, 多重耐药率 = $n(n \geq 3)$ 重耐药的菌株数/受试总菌株数^[26]。多重耐药指数 (multiple antibiotic resistance indexing, MARI) = 耐药株总数/(受试菌株总数 × 试验所用的抗菌药种类), 例如试验菌株总数为 5 株, 试验所用抗菌药种类为 12 种, 耐药株数为 38, 那么 $MARI = 38/(5 \times 12) = 0.63$ ^[27]。

2 结果与分析

2.1 异养菌的耐药率比较

鲍养殖场及养殖水体共分离获得 284 株细菌, 其中 XBB、XBS 分离所得菌株数分别为 62、72 株, DSB、DSS 分离所得菌株数分别为 69、81 株。根据质控范围和判定标准(表 2) 284 株受试菌株对 10 种抗菌药耐药率概况见图 1, 皱纹盘鲍消化道及其养殖水体异养菌对青霉素、卡那霉素、庆大霉素和利福平耐药率较高(均超过 50%), 对青霉素耐药率高达 83.95%; 对诺氟沙星、氯霉素、恩诺沙

星耐药率低于 10%, 尤其是诺氟沙星, 在水体菌中耐药率均为 0。比较 2 种不同养殖模式对同种抗菌药的耐药率发现, 结果差异不大, 但是从工厂化养殖鲍与水体分离(XBB 和 XBS)的菌株均对四环素与复方新诺明有较高耐药率, 占了总菌株的 65.14%。从不同来源菌株对单种抗菌药的耐药率来看, 消化道异养菌的耐药率普遍高于水体菌, 试验所用的 10 种药物中有 7 种耐药率均高于水体菌。

2.2 异养菌的多重耐药率及耐药指数的比较

多重耐药性 (multiple antibiotic resistance, MAR) 是指菌株同时对 2 类以上的抗菌药具抗性^[28], 因此, 该研究中将对 3 类或 3 类以上药物具抗性的菌株称为多重耐药株。结果显示, 受试菌株均没有对 10 种抗菌药同时耐药的菌株, 但出现对 10 种抗菌药高度敏感的菌株, 仅占菌株总数的 3.17% (9 株); 筛选发现, 菌株耐 3 ~ 4 类抗菌药的 MAR 最为集中, 分别耐 3、4、5 类抗菌药的 MAR 最大值出现在 DSB (33.33%)、XBB (22.58%)、XBB (17.74%); 耐 6 ~ 7 类药物的菌株所占比例较少, 仅 XBB 分离的异养菌最高可耐 7 类药物, 对青霉素、红霉素、卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明、利福平、诺氟沙星、恩诺沙星、四环素耐药, 并且消化道菌的 MAR (MAR ≥ 3) 高于对应分离水体菌的 MAR (表 3)。

表 2 非苛养细菌抑菌圈直径解释标准 (mm) 及质控直径限

Tab. 2 Bounds for diameter of antimicrobial susceptibility testing of strains using K-B diffusion method

抗菌药物 antibiotics	纸片含量 /个·μg ⁻¹ content in scrip	抑菌圈直径解释标准/mm bound for diameter of antimicrobial susceptibility testing			抑菌圈直径/mm diameter of antimicrobial circle	
		耐药 resistance	中介 intermediate	敏感 sensitive	大肠埃希氏杆菌 <i>E. coli</i> ATCC25922	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> ATCC25923
红霉素 (erythromycin)	15	≤13	14 ~ 22	≥23	—	22 ~ 30
青霉素 G (penicillin G)	10U	≤14	—	≥15	—	26 ~ 37
卡那霉素 (kanamycin)	30	≤13	14 ~ 17	≥18	17 ~ 25	19 ~ 26
氯霉素 (chloramphenicol)	30	≤12	13 ~ 17	≥18	21 ~ 27	19 ~ 26
庆大霉素 (gentamicin)	10	≤12	13 ~ 14	≥15	19 ~ 26	19 ~ 27
复方新诺明 (TMP/SMZ)	1.25/23.75	≤10	11 ~ 15	≥16	23 ~ 29	24 ~ 32
利福平 (rifampin)	5	≤16	17 ~ 19	≥20	8 ~ 10	26 ~ 34
诺氟沙星 (norfloxacin)	10	≤12	13 ~ 16	≥17	28 ~ 35	17 ~ 28
恩诺沙星 (enrofloxacin)	5	≤15	16 ~ 20	≥21	—	—
四环素 (tetracycline)	30	≤11	12 ~ 14	≥15	18 ~ 25	24 ~ 30

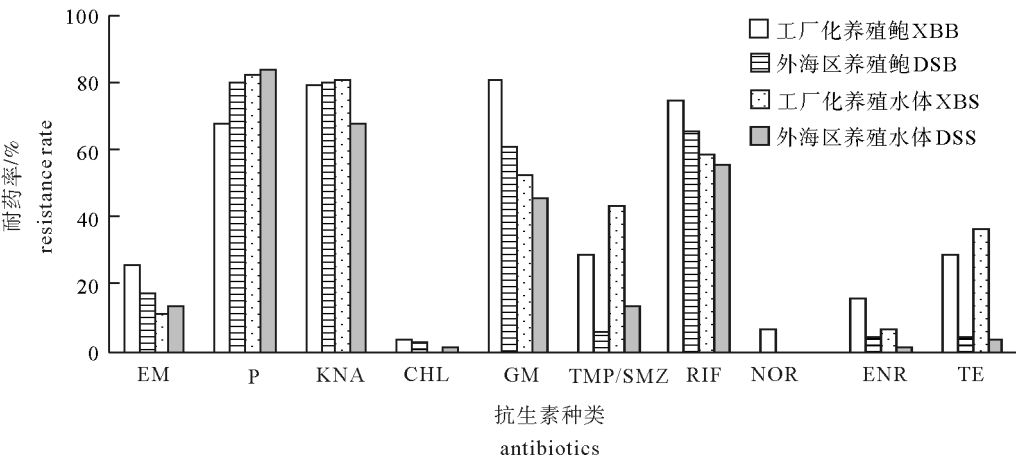


图 1 鲍消化道及其养殖水体异养菌的耐药率
EM. 红霉素; P. 青霉素 G; KNA. 卡那霉素; CHL. 氯霉素; GM. 庆大霉素; TMP/SMZ. 复方新诺明; RIF. 利福平;
Nor. 诺氟沙星; ENR. 恩诺沙星; TE. 四环素

Fig. 1 Resistance rate of strains from intestines of abalone and farming water to ten antibiotics
EM. erythromycin; P. penicillin G; KNA. kanamycin; CHL. chloramphenicol; GM. gentamicin; TMP/SMZ. paediatric compound
sulfamethoxazole tablets; RIF. rifampin; Nor. norfloxacin; ENR. enrofloxacin; TE. tetracycline

表 3 鲍消化道及其养殖水体异养菌的多重耐药率(MAR)

Tab. 3 Multiple antibiotic resistance (MAR) rate of strains from intestines of abalone and farming water							%
菌株来源 source of isolates	MAR(3)	MAR(4)	MAR(5)	MAR(6)	MAR(7)	MAR 累计 total of MAR	
工厂化养殖鲍 XBB	19.35	22.58	17.74	3.23	3.23	66.13	
外海区养殖鲍 DSB	33.33	17.39		1.45		52.17	
工厂化养殖水体 XBS	27.78	19.44	9.72			56.94	
外海区养殖水体 DSS	30.86	12.35	1.23	1.23		45.68	

注: MAR(3)表示菌株对三类药物具抗性,其余依次类推。
Note: MAR(3)represent strains resisting to three antibiotics and so on.

MARI 已成为确定特定采样点细菌耐药性的流行情况的良好统计工具,来源于频繁使用抗菌药区域的细菌 MARI 值大于 0.2,提示该区域处于抗菌药污染下;当抗菌药很少使用或者不用的时候,MARI 值低于 0.2^[27]。根据 1.4 的计算方法,该次分析结

果得到鲍消化道菌与水体菌在不同月份的 MARI,除了 5 月(XBS)、6 月(DSS)、8 月(DSS),其他月份的 MARI 均高于 0.2,最高均值是 0.41(XBB)(表 4),最低均值也有 0.28(DSS);由此可见,消化道菌的 MARI 均值总是高于对应水体菌的 MARI 均值。

表 4 鲍消化道及其养殖水体异养菌的多重耐药指数

Tab. 4 Multiple antibiotic resistance indexing (MARI) from intestines of abalones and farming water							
菌株来源 source of isolates	5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 August	9 月 September	10 月 October	多重耐药指数均值 average MARI
工厂化养殖鲍 XBB	0.48	0.53	0.38	0.38	0.37	0.38	0.41
外海区养殖鲍 DSB	0.43	0.39	0.32	0.30	0.21	0.31	0.32
工厂化养殖水体 XBS	0.10	0.40	0.39	0.31	0.31	0.39	0.33
外海区养殖水体 DSS	0.31	0.19	0.32	0.19	0.34	0.33	0.28

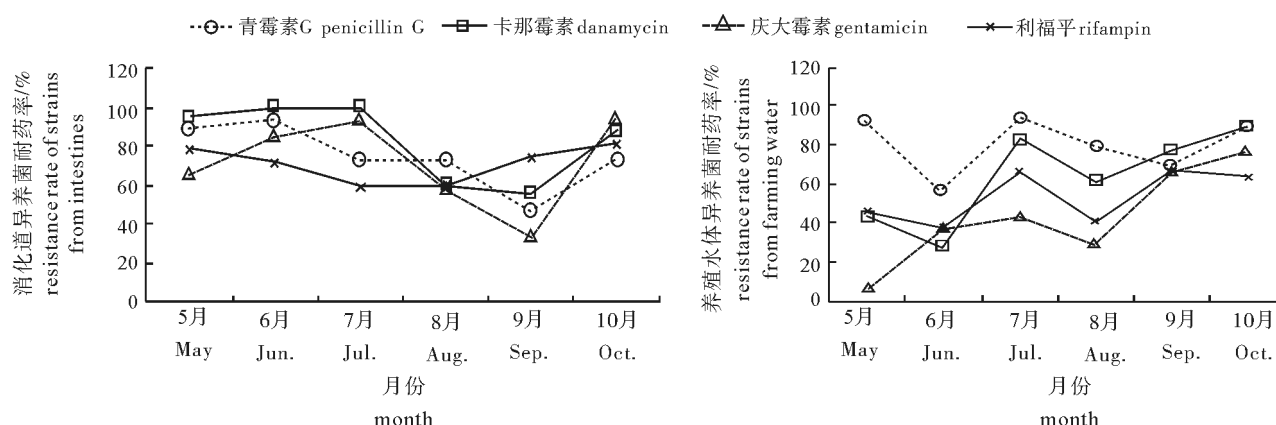


图2 消化道及其养殖水体异养菌在5月~10月的耐药率波动变化

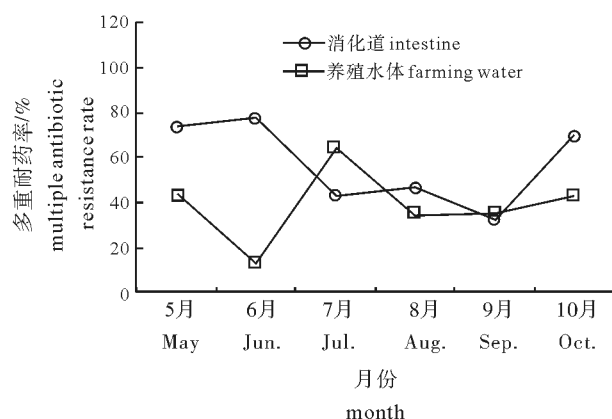
Fig. 2 Variation of resistant rate of strains from intestines and farming water of *H. discus hannai* to 10 antibiotics from May to October

图3 多重耐药率波动变化

Fig. 3 Variation of multiple antibiotic resistance rate of strains from intestine and farming water of *H. discus hannai* in different months

2.3 异养菌的耐药率变化

选取耐药率较高的4种抗生素计算来源不同的菌株在不同月份的耐药率及多重耐药率变化(图2,图3)。鲍体内外菌株对青霉素、卡那霉素、庆大霉素和利福平的耐药率随着时间的变化具有一定的季节波动规律;相同来源的菌株在相同的月份出现耐药率峰值,消化道异养菌对这4种抗生素的耐药率最低值出现在9月,水体菌耐药率最低值则出现在6月。对比消化道菌与水体菌的MAR变化,发现波动曲线趋势相似,消化道菌MAR在9月最低,水体菌MAR在6月最低,结果表明相同来源菌株耐药率及多重耐药率具有一定规律,并且水体菌耐药率最低值及MAR最低值均出现在6月,消化道菌则往后推迟3个

月,出现在9月。

3 讨论

3.1 鲍消化道及其养殖水体中异养菌耐药性分析

海区养殖环境相对于工厂化环境更为复杂、多变,而该研究结果显示分别来源于外海区养殖和工厂化养殖的皱纹盘鲍体内外的异养菌对单种抗菌药的耐药率并无差异,表明不同养殖模式与不同来源异养菌的耐药率也无差异。张瑜斌等^[29]也发现东海岛不同养殖模式对虾养殖水体中细菌的耐药性无显著差异,这是由于工厂化养殖水来源于海区海水,抗菌药可能存在交叉污染,耐药细菌或耐药因子的可转移性造成细菌获得耐药性所致。该研究中,284株异养菌对青霉素G的耐药率最高,XBB、DSB、XBS、DSS耐药率分别为67.74%、79.71%、81.94%、83.95%,水体异养菌对青霉素G的耐药率高于消化道异养菌,这也与之前的研究结果^[30]一致。自1942年开始青霉素G就被广泛使用^[31],贝类耐药性相关报道中发现大部分受试株均对青霉素G表现出高度耐药^[6,14,32-33],而在鱼类细菌中发现,青霉素G耐药率更高,从鱼体中分离到的29株嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)对青霉素100%耐药^[34]。这与青霉素的抗菌机制相关,因为青霉素主要作用于革兰氏阳性细菌、阴性球菌及螺旋体,大多数革兰氏阴性杆菌对青霉素不敏感^[35]。

该试验中菌株对喹诺酮类药物耐药率低,除了XBB,其余受试株对诺氟沙星高度敏感

(100%), 恩诺沙星在 XBB 中耐药率较高 (16.13%), 其余低于 10%, 这符合喹诺酮类药物主要对革兰氏阴性菌有强烈杀灭作用的特点^[36], 但诺氟沙星的中介敏感率介于 13.58% ~ 24.19%, 恩诺沙星为 39.51% ~ 55.07%; 且高玉龙等^[37]发现分离于阳江闸坡网箱养殖海水中的 88 株弧菌对恩诺沙星耐药率超过 50%, 喹诺酮类耐药率虽然不高, 但是敏感度也不高, 这值得注意。虽然目前较少发现对喹诺酮类药物高度耐药的报道, 但 ALEXANDRO 和 JERNIMO^[38]认为水产养殖环境中的细菌是处于多变的环境, 如果细菌长期处于亚抑菌浓度或者是低浓度抗菌药养殖环境中, 那么将会促进细菌耐药性的产生。这也说明了即使低耐药率的抗菌药, 投入使用一段时间后, 也有可能在这段时间内产生耐药性。

3.2 鲍消化道与养殖水体中异养菌多重耐药性及多重耐药指数分析

已有研究发现方斑东风螺源病原弧菌可对高达 31 种抗菌药耐药, 具有极高的多重耐药现象^[39]; 中国北方皱纹盘鲍养殖水体分离的 66 株弧菌耐 2 种抗菌药的耐药率为 97.0%, 氯霉素-氧四环素-氨基青霉素这一耐药谱占了 93.9%^[40]; 该研究显示鲍消化道异养菌的多重耐药率高于水体异养菌。由此可见, 贝类养殖环境中细菌的多重耐药性问题更值得关注。造成多重耐药性的原因, 有可能是养殖环境中养殖海水的交换, 使得养殖环境中存在的多重耐药细菌与耐药因子随之交换, 最终导致细菌多重耐药; 也有报道指出, 因为添加抗菌药的饲料使用逐渐增多, 部分养殖动物可能长期喂养加药饲料, 再加上病害暴发时, 养殖户缺乏正确的用药观念, 误用或滥用抗菌药, 导致多重耐药率上升^[41]。

不同来源的细菌多重耐药率有所差异, 鲍消化道异养菌的多重耐药率高于养殖水体, 并且消化道异养菌可对 9 种以上抗菌药耐药。不同养殖模式分离的细菌多重耐药性也有所差异, 来源于工厂化养殖场的菌株对四环素与复方新诺明的耐药率比分离自外海区养殖场的菌株高, 且前者的多重耐药率高于后者。这很可能是由于相对外海开放式养殖区, 工厂化养殖场使用抗菌药的频率更高所致, 在抗菌药的使用过程, 环境菌群也得到了筛选, 这种筛选作用也将很可能导致整个水环境中细菌生态失衡。

KRUMPERMA^[27]认为 MARI 高于 0.2, 则某地区分离的细菌处于抗菌药压力下, 该阈值在一定程

度上能够反映特定采样点抗菌药污染程度。该研究中发现工厂化养殖场和外海养殖区的 MARI 基本大于 0.2, 证实了鲍养殖环境中细菌耐药性的广泛性与频繁使用抗菌药的情况。另外, 特定环境中多重耐药菌的出现可能显示该区域已被抗菌药污染或频繁使用抗菌药^[42]。

鲍消化道及养殖水体异养菌多重耐药性及多重耐药指数表明鲍养殖环境已处于抗菌药污染中, 细菌耐药性较严重, 如果不减少抗菌药的使用与滥用, 该区域的细菌耐药性将会继续加重。为了控制海水养殖环境细菌耐药性, 不仅要呼吁政府部门和社会的参与, 控制抗菌药滥用, 加强抗菌药的科学使用、管理及法律, 而且要大力开发抗菌药替代品, 例如疫苗与抗菌肽等^[43]。

参考文献:

- [1] 柯才焕. 我国鲍鱼养殖产业现状与展望[J]. 中国水产, 2013 (1): 27-30.
- [2] 陈信忠, 龚艳清. 我国鲍养殖病害研究进展[J]. 福建水产, 2002(2): 8-13.
- [3] 杨宝丽, 王瑞旋, 王江勇, 等. 鲍养殖环境中弧菌密度变化及其与环境因子的关系[J]. 南方水产科学, 2015, 11(3): 95-102.
- [4] 叶林, 俞开康, 陈刚, 等. 皱纹盘鲍幼鲍溃烂病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 44-49.
- [5] 陈志胜, 吕军仪, 曾华, 等. 杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 溃疡症病原菌的研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 72-77.
- [6] 黄万红. 九孔鲍养殖中的脓疱病病因分析和药物敏感性研究[J]. 台湾海峡, 2005, 24(4): 526-532.
- [7] 聂丽平, 刘金屏, 丁明进, 等. 皱纹盘鲍脓疱病病原菌 - 河流弧菌 II (*Vibrio fluvialis*-II) 的生物学性状研究[J]. 中国微生物学杂志, 1995, 7(1): 33-36.
- [8] 聂丽平, 刘金屏, 丁明进, 等. 皱纹盘鲍脓疱病的防治方法初探[J]. 海洋科学, 1995, 9(5): 4-5.
- [9] 陈清华. 水产养殖业中抗菌药使用的风险及其控制[J]. 水产科技情报, 2009, 36(2): 67-72.
- [10] MICHEL C, ALDERMAN D. Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality [M]. Paris: Office International Des Epizooties, 1992: 71-138, 254-259.
- [11] STARLIPER C E, COOPER R K, SHOTTS Jr. E B, et al. Plasmid mediated romet resistance of *Edwardsiella ictaluri* [J]. J Aquat Anim, 1993, 5(1): 1-8.
- [12] 李爱华. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 87-91.
- [13] SAPKOTA A, SAPKOTA A R, KUCHARSKI M, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities [J]. Environ Int, 2008, 34(8): 1215-1226.

- [14] 祝玲, 周毅频, 蔡俊鹏, 等. 九孔鲍肠道及其养殖水体中弧菌抗药性的研究[J]. 海洋通报, 2005, 24(4): 32-35.
- [15] 李太武, 丁明进, 刘瑞玉, 等. 皱纹盘鲍脓疱病原菌-河流弧菌-II的抗药机制的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(6): 637-645.
- [16] WANG R X, WANG J Y, SUN Y C, et al. Antibiotic resistance monitoring in *Vibrio* spp. isolated from rearing environment and intestines of abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Mar Pollut Bull, 2015, 101(2): 701-706.
- [17] 王江勇, 王瑞旋, 苏友禄, 等. 方斑东风螺“急性死亡症”的病原病理研究[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 93-99.
- [18] 王瑞旋, 王江勇, 冯娟, 等. 军曹鱼养殖水体及其肠道弧菌的耐药性研究[J]. 南方水产, 2007, 3(5): 1-6.
- [19] 吴学贵, 周永灿, 谢珍玉, 等. 海南地区溶藻弧菌耐药性及其质粒多样性的研究[J]. 水产科学, 2012, 31(1): 50-54.
- [20] 王瑞旋, 耿玉静, 王江勇, 等. 杂色鲍哈维弧菌耐药质粒的鉴定和分析[J]. 南方水产科学, 2012, 8(2): 1-6.
- [21] 乔迁, 韩娜娜, 李琪, 等. 致病性假交替单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26): 14224-14226, 14232.
- [22] 胡珑玉, 宁喜斌, 贾玲华. 海水中溶藻弧菌的分离、鉴定及其耐药性分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 195-199.
- [23] 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 等. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析[J]. 海洋渔业, 2011, 33(4): 442-446.
- [24] 肖丹, 曹海鹏, 杨先乐. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌ERIC-PCR分型与耐药性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1092-1099.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute. Clsi document M100-S23 (ISBN1-56238-866-5) performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third informational supplement[S]. USA: Wayne, Pa, 2013: 46-47.
- [26] MANJUSHA S, SARITA G B, ELYASI K K, et al. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas [J]. Am J Biochem Biot, 2005, 1(4): 193-198.
- [27] KRUMPERMA P. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46(1): 165-170.
- [28] ELEONROI A, TENDENEIA, et al. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds [J]. Aquaculture, 2001, 195(3/4): 193-204.
- [29] ZHANG Y B, LI Y, SUN X L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China [J]. Mar Pollut Bull, 2011, 62(11): 2299-2307.
- [30] 王瑞旋, 林韵锶, 王江勇, 等. 海南陵水企鹅珍珠贝肠道及其养殖水体中异养细菌耐药性研究[J]. 热带海洋学报, 2013, 32(6): 96-100.
- [31] SMITH P A, ROMBERG F E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation [J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(9): 549-556.
- [32] 蔡俊鹏, 周毅频, 蔡创华. 九孔鲍养殖水体及其肠道不同菌群抗药性研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(6): 48-52.
- [33] 庞启华, 黄文芳. 杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)消化腺细菌的初步研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2002(1): 113-116.
- [34] 王静波, 徐立蒲, 王姝, 等. 北京地区养殖鱼类来源嗜水气单胞菌耐药性研究[J]. 北京农业, 2012(30): 77-80.
- [35] 祖玉梅. β -内酰胺类抗菌药的应用与发展现状[J]. 中国实用医药, 2010, 5(30): 246-248.
- [36] 郭少忠, 吴晓君. 浅谈渔药喹诺酮类[J]. 海洋与渔业, 2008(7): 17-20.
- [37] 高玉龙, 冯娟, 郭志勋, 等. 广东阳江市闸坡网箱养殖区弧菌耐药性分析[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(1): 32-35.
- [38] ALEXANDRO R R, JERNIMO R B, et al. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution [J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(6/7): 293-297.
- [39] 贾春红, 李淑芳, 张继东. 3株方斑东风螺病原性弧菌对35种常用抗菌药物的敏感性试验[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(3): 97-100.
- [40] DANG H Y, ZHAO J Y, CHANG Y Q, et al. Molecular characterizations of chloramphenicol and oxytetracycline-resistant bacteria and resistance genes in mariculture waters of China [J]. Mar Pollut Bull, 2009, 58(7): 987-994.
- [41] CHANG H K, YONG G K, SOO J O, et al. Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea [J]. Mar Pollut Bull, 2014, 86(1/2): 261-265.
- [42] TITILAWO Y, SIBANDA T, OKOH A, et al. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of faecal contamination of water [J]. Environ Sci Pollut Res, 2015, 22(14): 10969-110980.
- [43] 党宏月, 宋林生, 张志南, 等. 海水养殖环境细菌耐药性的危害[J]. 海洋科学集刊, 2006(1): 29-40.