

养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性分析*

王 岚^{1,3} 王印庚^{2,3①} 张 正^{2,3} 陈国华¹
廖梅杰^{2,3} 陈 霞⁴ 郭伟丽⁵

(1. 海南大学 海口 570228; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 4. 青岛九洋红水产科技有限公司 青岛 266071; 5. 山东亚康药业股份有限公司 潍坊 261000)

摘要 为了解引起养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性情况,针对2002–2010年由不同地区病样分离的27株细菌性病原进行了16S rDNA鉴定,并采用K-B法测定了27株细菌对22种抗生素的耐药性,分析了病原菌的耐药谱及耐药率变化。结果显示,大菱鲂腹水病病原菌主要有大菱鲂弧菌(*Vibrio scophthalmi*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas espejana*)。山东青岛地区以大菱鲂弧菌为主,威海地区以迟钝爱德华氏菌为主,烟台地区菌株种类分布平均。5类细菌对青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类、复方新诺明耐药率高于50%。只有1株迟钝爱德华氏菌对氟苯尼考产生了耐药,其余菌株对其均没有耐药性,且在长期使用中不易产生耐药性,证实氟苯尼考为当前防治腹水病的一种良好抗菌药物。27株病原菌的耐药谱数量为27个,每个菌株具备自己独特的耐药谱,74.1%的菌株对10种以上的抗菌药物产生了耐药性,均有多重耐药性。

关键词 大菱鲂; 腹水病; 致病菌; 16S rDNA; 耐药性

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0017-08

1992年,大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)自英国引入我国,随着苗种繁育技术的突破和工厂化养殖模式的建立,推动了我国海水养殖业的第四次发展浪潮。2015年渔业统计年鉴显示,2014年我国鲆鲽鱼类产量达到了 1.36×10^5 t,其中,大菱鲂产量占了近80%。然而,随着养殖规模化和集约化的发展,大菱鲂病害已成为产业中的突出问题,是阻碍产业可持续发展的主要瓶颈之一。目前,已报道的大菱鲂疾病达数10种,

致病原包括病毒(大菱鲂疱疹病毒、虹彩病毒等)、细菌[(弧菌(*Vibrio*)、链球菌(*Streptococcus* sp.)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)]等、寄生虫[盾纤毛虫(*Paralembus digitiformis*)、微孢子虫(*Tetramicra brevifilum*)、波豆虫(*Ichthyobodo* sp.)]等。其中,大菱鲂腹水病发生频率高、致病力强、死亡率高,在大菱鲂苗期和养成期均可暴发,是危害大菱鲂健康养殖的主要病害(王印庚等,2004)。该疾病的主要特征为发病前期病鱼腹部肿胀,

* “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD17B03)、山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205)和山东省海洋经济创新发展区域示范项目(山东省海水养殖重要疾病高效专用药物产业化及示范推广)共同资助[This work was supported by the National Key Technology R&D Program (2012BAD17B03); Independent Innovation and Achievements Transformation of Shandong Province (2014ZZCX06205); Regional Demonstration Project of Marine Economy Innovation and Development in Shandong Province (Industrialization and Popularization of High Efficiency Special Medicine for Mariculture Diseases)]. 王 岚, E-mail: wanglan_0829@163.com

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-04-17, 收修改稿日期: 2016-05-12

行动迟缓,摄食能力减弱;严重时肛部红肿凸出,胃部和鳍部出血,内脏团萎缩使腹部凹陷,基本不摄食,死亡率达到 80%以上。目前,有关大菱鲆腹水病致病病原的报道中,未发现病毒和寄生虫,已确定的致病病原为细菌性病原,主要包括鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)和大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*) (张正, 2004)¹⁾, 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) (李筠等, 2006)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) (张伟妮等, 2006)、鳗弧菌(Oisson *et al.*, 2006)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas espejiana*) (刘朝阳等, 2009)。在养殖过程中由于疾病的频繁发生, 养殖户使用各类抗生素和化学药物进行疾病防控, 长期的抗生素选择压力下, 细菌的抗药谱易发生变化, 不仅严重影响养殖生物的质量安全, 增加病原细菌对各类抗生素的耐药性, 同时还可能产生多重耐药性, 加大了治疗难度, 给养殖业者造成更多的经济损失, 海域生态环境也遭到破坏(战文斌等, 2004)。因此, 养殖过程中重大疾病的流行性预测及病原菌耐药性变化趋势的实时监测, 对指导健康养殖、减少疾病发生、增强渔药的高效安全使用具有重要的现实意义。

本团队自 2001 年起针对大菱鲆病害开展了基础性研究, 分离保存了大量细菌性病原并进行了广泛的病原学研究。根据养殖大菱鲆腹水病病原的相关报道, 其病因确定为细菌性病原。为了详细了解大菱鲆腹水病致病病原的流行性规律及其耐药状况, 对实验室多年来由养殖户送检的大菱鲆腹水病样品中分离保存的优势菌株进行了鉴定, 分析并检测了菌株对 22 种抗生素的耐药性, 系统分析山东半岛不同养殖区域腹水病致病病原的差异以及病原耐药性变化规律, 旨在为大菱鲆养殖过程中的疾病发生预警和安全用药提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2002–2010 年期间, 中国水产科学研究院黄海水产研究所收集了 27 例来自山东半岛沿海大菱鲆主要养殖区养殖户送检的患腹水病大菱鲆病样, 从样品中分离纯化了 27 株优势病原菌。将纯化后的菌株用含 20%甘油、1.5% NaCl 的菌种保藏液制备成菌悬液, 保存于-80℃冰箱中。其活化方法为取细菌冻存液在

室温下解冻, 采用划线法接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)上, 28℃培养 24 h 后备用。

1.2 抗生素的选择

选取了目前常见的 22 种抗生素, 分别为青霉素类: 青霉素(PEN, 10 μg/片), 苯唑青霉素(OXA, 1 μg/片); 头孢菌素类: 头孢哌酮(CPF, 75 μg/片), 头孢氨苄(LEX, 30 μg/片); 大环内酯类: 红霉素(ERY, 15 μg/片), 乙酰螺旋霉素(SPI, 30 μg/片); 四环素类: 四环素(TET, 30 μg/片), 强力霉素(DOX, 30 μg/片); 氨基糖苷类: 丁胺卡那(AMK, 30 μg/片), 庆大霉素(GEN, 10 μg/片); 喹诺酮类: 吡哌酸(PPA, 30 μg/片), 氧氟沙星(PFX, 5 μg/片), 诺氟沙星(NOR, 10 μg/片), 环丙沙星(CIP, 5 μg/片), 氟罗沙星(FLE, 5 μg/片), 恩诺沙星(ENR, 10 μg/片); 磺胺类: 复方新诺明(T/S, 25 μg/片); 硝基呋喃类药: 痢特灵(FUR, 300 μg/片); 氯霉素类: 氯霉素(CHL, 30 μg/片), 氟苯尼考(FFC, 30 μg/片); 利福平类: 利福平(RIF, 15 μg/片); 多粘菌素类: 多粘菌素 B(POL, 300 U)。用于耐药性实验的药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.3 细菌 16S rDNA 鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)提取活化后细菌的总 DNA, 以细菌 16S rDNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3'), 1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 60 s, 52℃退火 60 s, 72℃延伸 100 s, 30 个循环; 72℃延伸 20 min。对扩增产物进行切胶回收、纯化, 连接转化后, 选取阳性克隆测序, 利用 Blast 分析将所得序列与 NCBI 核酸数据库进行比对分析, 确定相应菌株的分类地位。

1.4 细菌耐药性检测

参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的纸片扩散法(K-B 法)进行。用游标卡尺测量抑菌圈直径, 计算其平均值, 选择大肠埃希菌作为质控菌株, 根据 NCCLS 发布的标准判断其耐药性。

1.5 数据的分析方法

根据抑菌圈直径数值判断每株细菌对 22 种抗生素的耐药情况, 分别以 R(耐药)、I(中性)、S(敏感)记

1) Zhang Z. Epizootic investigation and aetiological study on the bacterial diseases in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2004 [张正. 养殖大菱鲆流行病调查及主要细菌性疾病的病原学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]

录, 从而得到每株菌株对测试抗生素的耐药谱, 并对耐药谱进行命名统计。

同一类菌株的耐药率计算公式:

耐药率 $R\% = \frac{\text{对某一类抗生素耐药的菌株数量}}{\text{总测试菌株数量}} \times 100$

2 结果

2.1 细菌 16S rDNA 基因扩增及序列分析

采用通用引物对 2002–2010 年期间于山东青岛、烟台和威海地区所分离到的 27 株大菱鲂腹水病致病细菌的 16S rDNA 测序的 Blast 结果显示, 27 株细菌的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 核酸数据库序列的最高相似性达 99%–100%, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 大菱鲂弧菌 10 株、迟钝爱德华氏菌 7 株、鳗弧菌 5 株、哈维氏弧菌 3 株、假交替单胞菌 2 株。根据其他学者(张正等, 2004; 李筠等, 2006; 张伟妮等, 2006; Oisson *et al*, 2006; 刘朝阳等, 2009)的报道, 上述细菌均为鲆鲽类腹水病的致病原。

2.2 大菱鲂腹水病致病细菌的流行变化趋势分析

2.2.1 不同养殖区域病原的差异性分析 不同地区腹水病病原的区别见图 1。从图 1 可以看出, 青岛、威海、烟台病原菌分别有 13 株、8 株、6 株。其中, 鳗弧菌(5 株)、迟钝爱德华氏菌(7 株)在 3 个地区均有分布; 大菱鲂弧菌(10 株)在青岛、威海地区出现; 哈维氏弧菌(3 株)由威海、烟台地区的样品中分离; 假交替单胞菌(2 株)只在烟台地区出现。

2.2.2 病原检出率随时间的变化趋势 2002–2010 年各年 5 类病原菌的分布结果见图 2。从图 2 可以看出, 大菱鲂弧菌在每年的病样中均有分离, 具有连续性, 始终是感染大菱鲂腹水病的主要致病原; 迟钝爱德华氏菌随时间分离得到的概率由 2002 年的 8% 增加到 2010 年的 60%; 哈维氏弧菌和假交替单胞菌在早期有样品中得到, 在后期中并未分离得到; 鳗弧菌在 2002 年、2006 年和 2010 年均有所分离。

2.3 细菌耐药性分析

2.3.1 5 类病原菌对 22 种抗生素的耐药情况 5 类细菌对 22 种抗生素的耐药程度不同(图 3)。5 类细菌对青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类、复方新诺明耐药率高于 50%。大菱鲂弧菌、哈维氏弧菌、迟钝爱德华氏菌对四环素类的耐药率在 20%–30% 之间, 鳗弧菌和假交替单胞菌对 TET 无耐药性。5 类病原菌对 AMK、GEN、FUR、CHL、RIF、POL 的耐药率差

表 1 27 株细菌 16S rDNA 鉴定结果
Tab.1 Results of 16S rDNA identification for 27 bacterial strains

序号 No.	菌株编号 Strain No.	采样时间 Sampling time	采样地点 Sampling sites	鉴定结果 Identification result
1	Q261	2002–06	青岛 Qingdao	<i>V. anguillarum</i>
2	W271	2002–07	威海 Weihai	<i>V. harveyi</i>
3	Y281	2002–08	烟台 Yantai	<i>P. espejiana</i>
4	Q282	2002–08	青岛 Qingdao	<i>E. tarda</i>
5	W283	2002–08	威海 Weihai	<i>V. harveyi</i>
6	Q291	2002–09	青岛 Qingdao	<i>V. anguillarum</i>
7	Y292	2002–09	烟台 Yantai	<i>V. harveyi</i>
8	Y293	2002–09	烟台 Yantai	<i>P. espejiana</i>
9	W294	2002–09	威海 Weihai	<i>V. scophthalmi</i>
10	Q2101	2002–10	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
11	Q2111	2002–11	青岛 Qingdao	<i>V. anguillarum</i>
12	Q2112	2002–11	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
13	Q311	2003–01	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
14	Q312	2003–01	青岛 Qingdao	<i>E. tarda</i>
15	W351	2003–05	威海 Weihai	<i>V. scophthalmi</i>
16	Y352	2003–05	烟台 Yantai	<i>E. tarda</i>
17	Q421	2004–02	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
18	W4101	2004–10	威海 Weihai	<i>E. tarda</i>
19	Q641	2006–04	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
20	W651	2006–05	威海 Weihai	<i>V. anguillarum</i>
21	Q771	2007–07	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
22	Q8111	2008–11	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
23	Q1011	2010–01	威海 Weihai	<i>E. tarda</i>
24	Y1041	2010–04	烟台 Yantai	<i>E. tarda</i>
25	Y1051	2010–05	烟台 Yantai	<i>V. anguillarum</i>
26	Q1081	2010–08	青岛 Qingdao	<i>V. scophthalmi</i>
27	W1082	2010–08	威海 Weihai	<i>E. tarda</i>

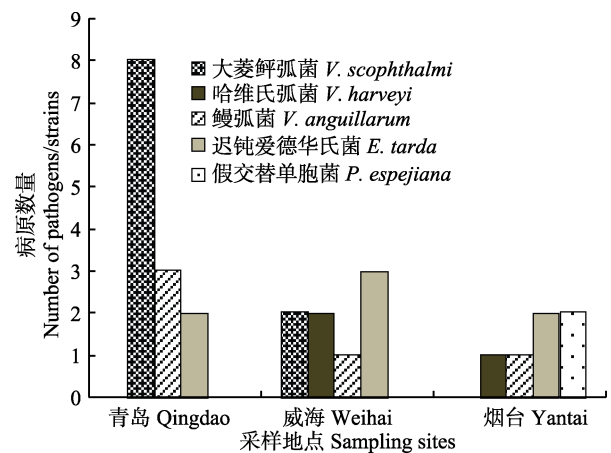


图 1 不同养殖区域腹水病病原菌的分布
Fig.1 Distribution of the pathogens associated with ascetic disease at different location

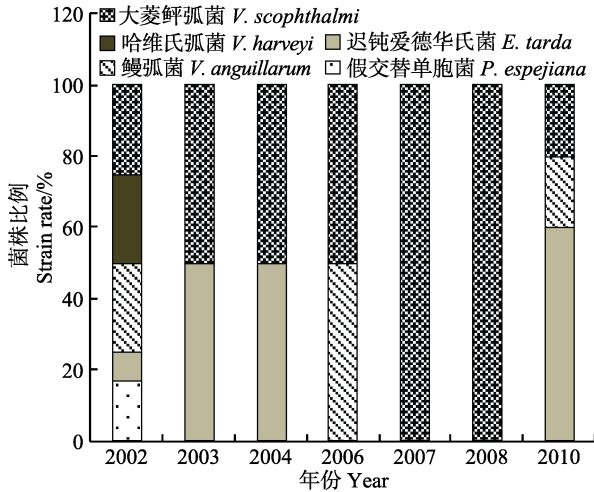


图 2 病原菌检出率随时间的变化
Fig.2 Change of detectable rate of pathogenic strain during 2002–2010

异较大,大菱鲆弧菌对 6 种抗生素的耐药率在 10%–50%;哈维氏弧菌对 AMK、GEN、RIF、POL 耐药率大于 50%,对 FUR、CHL 耐药率为 25%;鳎弧菌对 AMK、GEN、RIF、POL、FUR 的耐药率为 40%–60%,对 CHL 无耐药性;迟钝爱德华氏菌对 AMK、GEN、RIF、POL 耐药率高于 50%,对 FUR 耐药率为 14.3%,对 CHL 耐药率为 28.6%;假交替单胞菌对 AMK、GEN、RIF、POL、FUR 均无耐药性,对 CHL 耐药率为 50%。5 类病原菌对喹诺酮类药物的耐药性存在差异,所有菌株对 PPA、ENR 耐药率高于 50%;大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌对 NOR、CIP、FLE 耐药率在 20%–50%;假交替单胞菌对这 3 种抗菌素均无耐药性;鳎弧菌对 NOR、CIP 无耐药性,对 FLE 耐药率为 20%;迟钝爱德华氏菌对 NOR 无耐药性,对 CIP、FLE 耐药率分别为 28.6%、14.3%;大菱鲆弧菌对 PFX 的耐药率为 10%,其余 4 类菌株对 PFX 无耐药性。

此外,迟钝爱德华氏菌对 FFC 的耐药率为 14.3%(1/7),其他 4 类细菌对其无耐药性。

迟钝爱德华氏菌、鳎弧菌和大菱鲆弧菌耐药率随时间的变化情况见表 2。从表 2 可以看出,哈维氏弧菌和假交替单胞菌的数量较小,不具备分析其耐药率的变化规律条件。迟钝爱德华氏菌对 CPF、ERY、TET、DOX、AMK、PPA、ENR、T/S、FFC、RIF 的耐药率提高,对 GEN、FUR 的耐药率降低。鳎弧菌对 LEX、ERY、AMK、GEN、T/S、RIF 的耐药率提高,对 FUR 的耐药率降低。大菱鲆弧菌对 ERY、T/S、RIF 的耐药率提升,对 FUR、CHL 的耐药性减弱。

2.3.2 病原菌耐药谱 耐药谱型可分为 27 种,结果见表 3。从表 3 可以看出,A–J 为大菱鲆弧菌的耐药谱,K–Q 为迟钝爱德华氏菌的耐药谱,R–V 是鳎弧菌的耐药谱,W–Y 是哈维氏弧菌的耐药谱,Z、α 为假交替单胞菌的耐药谱。27 株病原菌都对唯一对应的耐药谱,且从耐药数量上看,所有的病原菌对至少 4 种以上的抗生素具有耐药性,6 株对 6–9 种抗生素产生耐药性,20 株(74.1%)对 10 种以上的抗生素产生耐药,有 1 株哈维氏弧菌对 17 种抗生素产生了耐药性。

3 讨论

在本研究的前期工作中,根据不同养殖区送检的 27 例大菱鲆疾病样品流行性调查与检测分析可知,这 27 例样品均患有腹水病。通过对分离纯化的病原菌 16S rDNA 测序分析来看,大菱鲆腹水病的致病原有大菱鲆弧菌、鳎弧菌、哈维氏弧菌、迟钝爱德华氏菌和假交替单胞菌。不同地区发现的主要致病原也有所不同,青岛地区以大菱鲆弧菌为主,威海地区以迟钝爱德华氏菌为主。疾病的发生与环境、饵料、自身免疫力等因素密切相关。在大菱鲆的人工养殖中,其养

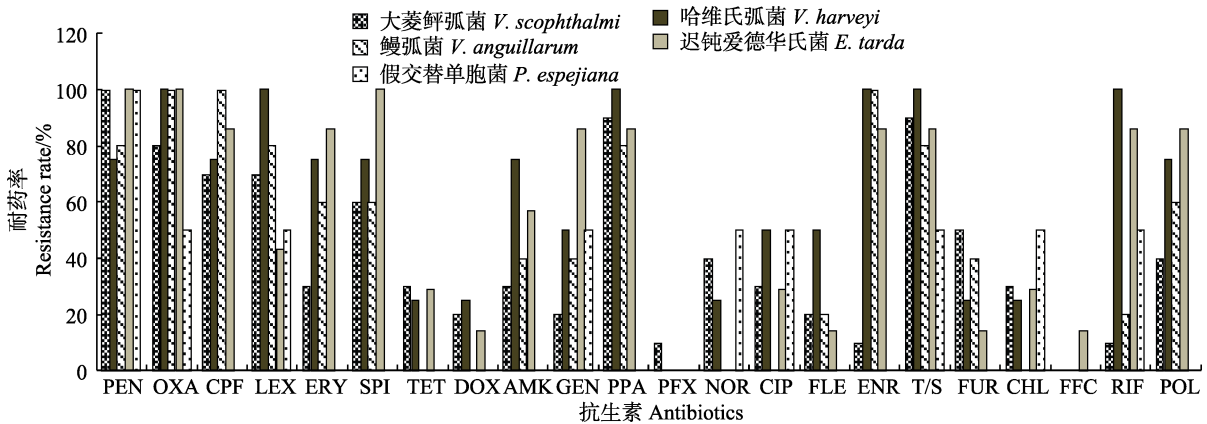


图 3 5 类病原菌对 22 种抗菌药物的耐药情况
Fig.3 Resistance of 22 antibiotics of five types of pathogens

表 2 3 类菌株对 22 种药物的耐药率变化情况
Tab.2 Changes of resistance rate among three pathogenic strains in response to 22 antibiotics agents (%)

抗菌药物 Antibacterials	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>		鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>		大菱鲂弧菌 <i>V. scophthalmi</i>	
	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2
青霉素 PEN	100	100	66.7	100	100	100
苯唑青霉素 OXA	100	100	100	100	83.3	75
头孢哌酮 CPF	75	100	100	100	66.7	75
头孢氨苄 LEX	50	33.3	66.7	100	83.3	50
红霉素 ERY	75	100	33.3	100	16.7	50
乙酰螺旋霉素 SPI	100	100	66.7	50	50	75
四环素 TET	25	33.3	0	0	33.3	25
强力霉素 DOX	0	33.3	0	0	16.7	25
丁胺卡那 AMK	50	66.7	33.3	50	33.3	25
庆大霉素 GEN	100	66.7	0	100	16.7	25
吡哌酸 PPA	75	100	100	50	100	75
氧氟沙星 PFX	0	0	0	0	16.7	0
诺氟沙星 NOR	0	0	0	0	16.7	75
环丙沙星 CIP	25	33.3	0	0	16.7	50
氟罗沙星 FLE	25	0	0	50	16.7	25
恩诺沙星 ENR	75	100	100	100	100	100
复方新诺明 T/S	75	100	66.7	100	83.3	100
痢特灵 FUR	25	0	66.7	0	66.7	25
氯霉素 CHL	25	33.3	0	0	33.3	25
氟苯尼考 FFC	0	33.3	0	0	0	0
利福平 RIF	75	100	0	50	0	25
多粘菌素 POL	100	66.7	33.3	100	50	25

注: R_1 为 2002–2005 年菌株的耐药率; R_2 为 2006–2010 年菌株的耐药率

Note: R_1 : the strains resistance rate from 2002 to 2005; R_2 : the strains resistance rate from 2006 to 2010

殖条件多样, 各个地区的养殖水域环境也各不相同, 养殖户的苗种来源不同, 投入饵料等也存在差异, 从而可能导致不同养殖地区大菱鲂腹水病的病原存在多样性和差异性。

目前, 病原菌的耐药性问题在水产养殖病害防治中得到越来越多的关注, 很多学者针对细菌耐药性开展调查。写腊月等(2011)报道了 184 株弧菌对 8 类 13 种抗生素的耐药情况, 对 T/S、RIF、卡那霉素的耐药率分别为 57.6%、54.3%、45.7%, 且 80.4% 的菌株对 3 种以上的药物产生了耐药性, 说明菌株的多重耐药性现象严重。刘旭等(2015)报道了养殖大菱鲂和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)样品中分离的弧菌对 ERY、T/S 的耐药率高达 57.1%、44.3%, 多重耐药菌株比例 78.6%。葛慕湘等(2015)报道了 35 株分离自牙鲆的迟钝爱德华氏菌对青霉素、RIF、卡那霉素的耐药率分别为 100%、42.9% 和 28.6%, 所有菌株都具有多重耐药性, 大部分的菌株对 7–9 种抗生素有耐药性。刘朝阳等(2009)由大菱鲂分离出的假交替单胞菌

耐药性检测中发现, 该菌株对 REN、T/S、RIF、CHL 耐药, 对 CPF 敏感。由此可知, 细菌耐药性在水产养殖中普遍存在, 且大多数细菌均有多重耐药性, 这与本研究得到的结果基本吻合。

细菌的耐药性分为固有耐药性和遗传耐药性, 细菌耐药性的产生是由于在外界抗生素的选择压力下, 自身基因突变或者通过耐药质粒转移作用从外界获得新的耐药基因(Alderman *et al*, 1998)。PEN、PPA、T/S、RIF 作为水产疾病治疗中常用的抗菌药, 5 类细菌对其耐药率均高于 50%, 而且耐药率随着时间的延续而增强, 这可能与养殖户在疾病治疗过程中盲目选择抗生素、缺乏针对性、用药剂量大、用药方法不当有一定的关系。

20 世纪 80、90 年代, CHL 是我国水产养殖病害防治中的常用抗生素, 但易产生耐药性, 极易造成再生障碍性贫血等缺点, 2002 年 3 月被国家明令禁止。FFC 作为新一代的氯霉素类动物专用合成抗生素具有广谱抗菌、杀菌作用强、不易产生耐药性、易吸收、

表 3 27 株病原菌株耐药谱型
Tab.3 Antibiogram types of 27 pathogenic bacterium

谱型 Types	耐药数量 Number of resistance	菌株编号 Strain number	耐药谱 Antibiogram
A	7	W294	PEN,OXA,CPF,PPA,ENR,T/S,FUR
B	10	Q2101	PEN,OXA,CPF,LEX,AMK,PPA,ENR/T/S,FUR,POL
C	10	Q2112	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,PPA,ENR,FUR,POL
D	11	Q311	PEN,OXA,CPF,LEX,SPI,TET,DOX,PPA,ENR,T/S,CHL
E	9	W351	PEN,LEX,AMK,GEN,PPA,FLE,ENR,T/S,POL
F	13	Q421	PEN,OXA,LEX,SPI,TET,PPA,PFX,NOR,CIP,ENR,T/S,FUR,CHL
G	11	Q641	PEN,OXA,CPF,LEX,SPI,PPA,NOR,FLE,ENR,T/S,POL
H	15	Q771	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,AMK,GEN,PPA,NOR,CIP,ENR,T/S,FUR,RIF
I	7	Q8111	PEN,OXA,ERY,SPI,PPA,ENR,T/S
J	9	Q1081	PEN,CPF,TET,DOX,NOR,CIP,ENR,T/S,CHL
K	13	Q282	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,GEN,PPA,CIP,FLE,ENR,RIF,POL
L	13	Q312	PEN,OXA,CPF,ERY,SPI,AMK,GEN,PPA,ENR,T/S,FUR,RIF,POL
M	8	Y352	PEN,OXA,LEX,SPI,AMK,GEN,T/S,POL
N	13	W4101	PEN,OXA,CPF,ERY,SPI,TET,GEN,PPA,ENR,T/S,CHL,RIF,POL
O	15	W1011	PEN,OXA,CPF,ERY,SPI,TET,DOX,PPA,CIP,ENR,T/S,CHL,FFC,RIF,POL
P	12	Y1041	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,AMK,GEN,PPA,ENR,T/S,RIF
Q	12	W1082	PEN,OXA,CPF,ERY,SPI,AMK,GEN,PPA,ENR,T/S,RIF,POL
R	10	Q261	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,PPA,ENR,FUR,ERY
S	10	Q291	PEN,OXA,CPF,LEX,SPI,AMK,PPA,ENR,T/S,FUR
T	6	Q2111	OXA,CPF,PPA,ENR,T/S,POL
U	12	W651	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,GEN,PPA,FLE,ENR,T/S,ERY,POL
V	12	Y1051	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,AMK,GEN,ENR,T/S,ERY,POL
W	17	W271	PEN,OXA,LEX,ERY,SPI,TET,DOX,AMK,GEN,PPA,CIP,ENR,T/S,FUR,CHL,RIF,POL
X	15	W283	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,AMK,GEN,PPA,NOR,CIP,FLE,ENR,T/S,RIF
Y	12	Y292	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,AMK,PPA,ENR,T/S,RIF,POL
Z	4	Y281	PEN,OXA,LEX,T/S
α	10	Y293	PEN,OXA,CPF,LEX,ERY,SPI,PPA,ENR,T/S,CHL

毒副作用小等优点,被广泛应用于水产养殖疾病防控中(朱黎明,2004)。刘淇等(2004)研究对比了 CHL 与 FFC 对 8 株水生生物致病性弧菌的抑菌效果差异,结果显示,FFC 对临床分离的致病原抑菌杀菌效果明显优于 CHL。在本研究中,大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、迟钝爱德华氏菌、假交替单胞菌对 CHL 的耐药率高于 25%,只有鳗弧菌对 CHL 无耐药性;而迟钝爱德华氏菌对 FFC 的耐药率为 14.3%,其他 4 类细菌对其无耐药性。这也说明了 FFC 的抗菌作用优于 CHL,而且在长期使用过程中不易产生耐药性,说明 FFC 为一种优良的水产疾病抗菌药物。

此外,根据 27 株病原菌的耐药谱可见,每个菌株具备自己独特的耐药谱,74.1%的菌株对 10 种以上的抗生素产生了耐药性,说明这些病原菌普遍存在多重耐药性,由此也增加了疾病治疗的难度。在实际生

产中,为了避免细菌耐药性的增强和多重耐药性的产生,应该合理选用药物,对症用药;确保药物的最佳用量,适宜的用药疗程和日投药次数;避免长期使用同一种或一类抗生素,探索科学合理的联合用药方式。

在疾病治疗中,采取“以防为主,防治结合”的基本原则。抗生素的大量使用会导致细菌对抗生素产生耐药性,还可能产生多重耐药性,不仅加大了治疗的难度,也会影响海域环境(李国烈等,2012)。近年来有研究表明,中草药在治疗大菱鲆腹水病的治疗中可发挥良好作用,有效控制疾病的发展(张建等,2013)。任海等(2010)发明了一种对大菱鲆腹水病、肠炎病、红体病等细菌性疾病有良好的预防和治疗作用的复方中草药,治愈率可达到 80%以上。中草药还可以增强机体的非特异性免疫力和抗病能力(李华等,2013)。此外,在养殖过程中还可以使用益生菌对腹

水病进行预防和治疗。益生菌可以对病原菌产生竞争性抑制,还可以产生抑制性物质,从而达到杀菌或者抑菌的作用。同时,益生菌还可以提高机体的免疫功能,从而抵御病原菌侵袭的能力(Pandiyan *et al*, 2013)。樊瑞锋等(2011)从健康大菱鲂肠道内分离一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),将该菌作为饲料添加剂与饵料混合后投喂大菱鲂,不仅不影响它正常生长,还对大菱鲂腹水病和肠炎病的致病菌有很好的拮抗作用。另外,渔用疫苗的开发也能够对疾病的预防产生良好的效果,不仅能提高动物自身的免疫水平、增强机体对疾病的抵抗能力,还符合绿色、环保的要求,因此,渔用疫苗受到越来越多的关注。张正等(2004)发明了一种鲆鲽鱼类五联灭活疫苗,接种后可以有效预防鲆鲽鱼类受鳃弧菌、大菱鲂弧菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、迟钝爱德华氏菌5种细菌性病原菌的感染。

细菌耐药性的产生并不是单一因素影响,而是与多种条件相关(Neu, 1992)。本实验主要进行了细菌耐药表型的相关研究,在后续的工作中应深入探讨影响细菌耐药性的具体原因、耐药性产生的机理等问题。在养殖过程中,需要长期对不同养殖环境、不同养殖区域的各种疾病病原菌进行耐药监测和耐药性流行性分析,以便及时了解各种疾病的流行性状况、病原的分布特点和耐药性的变化规律、在疾病的治疗中用药剂量、用药频率以及给药方式等对细菌耐药性产生的影响,为水产动物疾病的预警和合理使用抗生素提供有力的证据。虽然本研究团队采集了大量样品,但由于保存时间较久,有些年份的菌株活化率不足,造成样品量不均衡,所以上述结果仅供读者参考,今后仍需积累样品进行更加完善的研究分析。

参 考 文 献

- Alderman DJ, Hastings TS. Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, 1998, 33(2): 139–155
- Fan RF, Wang YG, Liang Y, *et al*. Screening and identification of a eurythermal probiotic bacterium in the intestine of cultured *Scophthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 40–46 [樊瑞锋, 王印庚, 梁友, 等. 一株广温性大菱鲂肠道益生菌的筛选与鉴定. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 40–46]
- Ge MX, Jin XM, Zhang YY, *et al*. Detection of drug resistance and four drug resistance genes in bacterial pathogen *Edwardsiella tarda*. *Fisheries Science*, 2015, 34(5): 300–304 [葛慕湘, 靳晓敏, 张艳英, 等. 迟钝爱德华氏菌耐药表型及4种耐药基因检测. *水产科学*, 2015, 34(5): 300–304]
- Li GL, Li LG, Fang WH. Antibiotic resistance of bacterial isolates from aquatic animals and its prevention and control. *Fishery Information and Strategy*, 2012, 27(4): 316–321 [李国烈, 李林桂, 房文红. 水产动物源细菌耐药性与预防控制. *渔业信息与战略*, 2012, 27(4): 316–321]
- Li H, Zhang TE, Li Q. Influence of compound Chinese herbal medicine on non-specific immunity of turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(2): 115–120 [李华, 张太娥, 李强. 复方中草药对大菱鲂非特异性免疫力的影响. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(2): 115–120]
- Li Y, Yan XH, Chen JX, *et al*. Studies on the characteristics of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Scophthalmus maximus*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(4): 649–654 [李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲂腹水病病原的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(4): 649–654]
- Liu Q, Li J, Wang Q. Study on antibacterial effect *in vitro* of Florfenicol with eight *Vibrios*. In *aquaculture*. *China Fisheries*, 2004(z1): 258–260 [刘淇, 李健, 王群. 氟苯尼考对8株水产动物致病性弧菌的体外抑菌作用. *中国水产*, 2004(z1): 258–260]
- Liu X, Ma LC, Li J, *et al*. Epidemiology and drug resistance analysis of 323 *Vibrios* from aquaculture. *Veterinary pharmacology and toxicology branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine (CAAV) congress and the 13th seminar and the fifth conference with veterinary toxicology professional committee of the Chinese society of toxicology (CST)*, 2015 [刘旭, 马立才, 李健, 等. 323株水产养殖源弧菌流行特征及耐药性分析. *中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会*, 2015]
- Liu ZY, Wang YG, Sun XQ. Correlation between bacteria in feed pellets and diseases of cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(4): 13–21 [刘朝阳, 王印庚, 孙晓庆. 颗粒饲料携带细菌与大菱鲂疾病发生的相关性. *南方水产*, 2009, 5(4): 13–21]
- Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992, 257(5073): 1064–1073
- Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, *et al*. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 2013, 5(1): 55–59
- Oisson JC, Jöborn A, Westerdahl A, *et al*. Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 19(3): 225–234
- Ren H, Liao MJ, Zhang ZH, *et al*. Multiple-effect Chinese herbal medicine compound of bacterial diseases of turbot. ZL201010100782.8, 2010 [任海, 廖梅杰, 张正, 等. 大菱鲂细菌性疾病的中药复方. 专利号: ZL201010100782.8, 2010]
- Wang YG, Zhang Z, Qin L, *et al*. The main diseases of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and their prevention and treatment. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 61–68 [王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲂主要疾病及防治技术. *海洋水产研究*, 2004, 25(6): 61–68]
- Wang YG, Qin L, Zhang Z, *et al*. *Edwardsiellosis* in cultured *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(4): 487–495 [王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲂的爱德华氏菌病. *水产学报*, 2007, 31(4): 487–495]
- Xie LY, Hu LL, Fang WH, *et al*. Investigation and analysis of

- drug resistance of *Vibrios* from mariculture source. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 442–446 [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. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 442–446]
- Zhan WB, Liu HM, Wang Y. Medications for aquaculture diseases and the safety of aquatic product. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2004, 34(5): 758–760 [战文斌, 刘洪明, 王越. 水产养殖病害及其药物控制与水产品安全. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(5): 758–760]
- Zhang WN, Zhou L, Xing J, *et al.* Isolation and identification of pathogen SR1 associated with swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 603–609 [张伟妮, 周丽, 邢婧, 等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 603–609]
- Zhang J, Kong WJ. The Use of Chinese herbal technology to prevent and control enteritis disease in turbot. *Hebei Fisheries*, 2013(2): 35–35 [张健, 孔维军. 利用中草药防治大菱鲆肠炎病技术探讨. *河北渔业*, 2013(2): 35–35]
- Zhu LM. Florfenicol-the latest substitute products of chloramphenicol in the aquaculture. *Hebei Fisheries*, 2004(3): 28 [朱黎明. 氟苯尼考——水产养殖业中氯霉素的最新替代产品. *河北渔业*, 2004(3): 28]
- Zhang Z, Wang YG, Yang GP, *et al.* The present status of research on bacterial diseases of turbot *Scophthalmus maximus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(3): 83–87 [张正, 王印庚, 杨官品, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)细菌性疾病的研究现状. *海洋湖沼通报*, 2004(3): 83–87]

(编辑 陈严)

Diversity and Drug Resistance of Bacterial Pathogens Isolated from Bacterial Ascetic Disease in Cultured Turbot *Scophthalmus maximus*

WANG Lan^{1,3}, WANG Yingeng^{2,3①}, ZHANG Zheng^{2,3}, CHEN Guohua¹,
LIAO Meijie^{2,3}, CHEN Xia⁴, GUO Weili⁵

(1. Hainan University, Haikou 570228; 2. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. Qingdao Sunny Ocean Aquatic Technology Co., Ltd, Qingdao 266071; 5. Shandong Yakang Pharmaceutical Co., Ltd, Weifang 261000)

Abstract Turbot *Scophthalmus maximus* was introduced into China in 1992. Since then, it has become one of the most dominant mariculture industries. In recent years, however, a main bottleneck constraining its commercial development is the disease problem prevailing in the farms and causing significant mortalities. Ascites syndrome is a disease that is commonly found in larvae culture and grow-out period. The present study investigated the diversity and antimicrobial resistance of the pathogens isolated from bacterial ascetic disease in cultured turbot *S. maximus* in Shandong Province. In total, 27 bacterial pathogens were collected from different regions of the province between 2002 and 2010. These 27 strains of pathogens were identified through the use of 16S rDNA gene sequence analysis and their antibiotic resistance profiles were tested with 22 common antibiotics using the Kirby-Bauer disc diffusion methodology. The antimicrobial susceptibility data were used to identify correlations between antibiogram and the change of resistance. The results demonstrated that *V. scophthalmi*, *E. tarda*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *P. espejiana* were the pathogenic strains associated with ascetic disease of cultured turbot. The major pathogenic strain was *V. scophthalmi* in Qingdao area and *E. tarda* in Weihai area, whereas all pathogenic strains were equally found in Yantai area. Five bacterial strains were resistant to Penicillin, Cephalosporins, Macrolides and T/S with resistance rates over 50%. In addition, the resistance rate to FFC was below 10%, and was little drug resistance in the long-term use, suggesting that FFC is a favorable antibacterial drug to prevent and treat the ascites disease in cultured turbot. Twenty-seven pathogenic bacteria formed 27 antibiogram types since all the strains had multiple antibiotic resistance. 74.1% of the strains were resistant to more than ten different types of antibiotics. In conclusion, the drug resistance rates among aquatic bacteria were very high, becoming the primary problem in the prevention of aquatic bacterial diseases. The results provide theoretical basis and reference for the epidemiological studies of turbot ascetic disease and its early prevention.

Key words *Scophthalmus maximus*; Ascites; Pathogen; 16S rDNA; Antibiotic resistance

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn