

牡蛎体内及其养殖水体中细菌耐药性研究

王瑞旋¹, 李 炳², 林华剑³, 陈 琦⁴, 陈秀程^{2,5}, 牟红莉², 王江勇²

(1. 韩山师范学院, 广东 潮州 521041; 2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 3. 广东省水生动物疫病预防控制中心, 广东 广州 511400; 4. 华南师范大学, 广东 广州 510631; 5. 天津农学院, 天津 300384)

摘要: 为进一步了解牡蛎体内外细菌的耐药性, 对分离自阳江的香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) 养殖水体及其内脏团的 637 个异养细菌进行了 10 种抗生素的药敏试验。采用纸片扩散法(Kirby-Bauer, 简称 K-B), 参照 NCCLS 抗生素敏感试验操作标准, 研究细菌的耐药概况。结果显示: 健康牡蛎体内细菌对恩诺沙星和庆大霉素耐药率较低, 发病牡蛎体内细菌对庆大霉素耐药率最低, 次之为复合磺胺和恩诺沙星; 水体细菌对氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星耐药率较低, 水体及体内细菌对呋喃唑酮耐药率最高, 而对卡那霉素及青霉素耐药率则波动较大。结果还显示, 不同来源的受试菌株多重耐药状况严重, 来源于健康和病牡蛎的菌株在 7 月份的多重耐药率达到峰值, 分别为 66.7%和 64.3%, 养殖水体细菌多重耐药率峰值出现在 4 月份, 最高达 76.7%。总体来看, 源于牡蛎养殖环境水体及其牡蛎体内的异养菌多重耐药比例较高, 值得引起注意。而受试菌株对不同药物的抗性存在较大差异, 且异养细菌对呋喃唑酮的耐药率明显高于对其它受测抗生素的耐药率。从时间动态上看, 水体菌耐药率峰值出现于 4 月份, 而牡蛎体内菌群耐药率峰值出现于 7 月份。

关键词: 香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*); 异养菌; 弧菌; 抗生素; 耐药性

中图分类号: P745.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2020)06-0056-08

DOI: 10.11759/hyxx20191210001

牡蛎, 俗称海蛎子、蚝等, 是我国著名的四大养殖经济贝类之一。牡蛎属滤食性动物, 通过不断过滤海水来获取其中的微生物作为食物。在滤食过程中, 随着时间的变化可积聚环境水体中的细菌, 其中包括致病菌^[1]。香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)是我国南方重要海水养殖贝类, 主要分布于浙江、江苏、福建、广东和广西等沿海低潮区^[2-3]。正常养殖情况下, 其产量高、经济效益良好。然而, 自 1992 年以来频发的大规模死亡事件严重影响了牡蛎养殖业的发展, 造成了巨大的经济损失^[4]。细菌性疾病在贝类养殖病害事件中常扮演重要角色, 尤其在高温季节, 牡蛎大批量异常死亡现象时有发生, 其中以条件致病性著称的弧菌(*Vibrio*)出现频率最高。在海洋环境中, 弧菌几乎无处不在, 包括海水、底泥等, 甚至健康牡蛎的体内都可能存在弧菌。在养殖过程中, 当牡蛎抵抗力低下且环境中致病性弧菌达到一定阈值时, 即可能导致疾病的发生, 从而引起大量死亡。尤其是刚固着的稚贝更易受到感染, 病原菌往往借助水流及牡蛎自身的滤食性, 在贝体内积累, 当条

件适合时, 即可能侵袭贝体韧带、外套膜和鳃, 最后全身感染而死^[5]。至今, 与细菌性疾病直接相关的防治手段仍以抗生素为主, 抗生素已被广泛应用于控制人类、畜禽和水生动物的细菌性疾病。由于水环境的复杂性和流动性, 抗生素在水产养殖中的应用很可能对环境产生更为严重的不良影响。甚至在盲目使用抗生素后, 取得的效果常常与养殖户的预期相悖。在抗生素的选择压力下, 耐药菌保留下来并大量繁殖^[6-7]。已有报道对杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 体内及其养殖水体中异养细菌耐药性进行研究, 发

收稿日期: 2019-12-10; 修回日期: 2020-02-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030313112); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49); 广东省乡村振兴战略专项(粤财农[2019]73 号); 国家自然科学基金项目(31902416)

[Foundation: Natural science foundation of Guangdong province, No. 2017A030313112; Special funds for the construction of modern agricultural industrial technology system, No. CARS-49; Guangdong province rural revitalization strategy special project, No. Yuecai nong [2019] no. 73; National Natural Science Foundation of China, No. 31902416]

作者简介: 王瑞旋(1979-), 女, 广东揭阳人, 副研究员, 博士, 主要从事水生生物病害防治研究, E-mail: wangruixuan@scafsri.ac.cn; 王江勇, 通信作者, 电话: 020-89108321, E-mail: wjy104@163.com

现大多数菌株对四环素、青霉素 G、卡那霉素、丁胺卡那霉素等产生了抗药性^[8]。叶茂华等^[9]对贝类中弧菌耐药性研究发现, 受试的 28 株菌中有 25 株对氨苄西林耐药, 1 株对四环素耐药; 邓欢等^[10]对从太平洋牡蛎发病幼体中分离的三种弧菌进行耐药性鉴定, 显示 3 株菌均对氯霉素、红霉素敏感, 对呋喃唑酮、青霉素耐药; 张占会等^[11]对 4 株香港牡蛎致病菌进行药敏测定, 结果显示菌株均对青霉素类药物具有抗性。而笔者在以往对鲍体内弧菌的耐药性研究中发现, 弧菌对多种药物的耐药率与环境因子显著相关并呈现一定的季节规律性^[12]。目前国内关于贝类养殖水体及贝体内细菌的耐药性研究极少, 而牡蛎作为重要的滤食性贝类, 与养殖环境关系密切, 且牡蛎属于河口养殖种类, 更接近人类居住环境及陆地养殖系统, 因此, 对牡蛎养殖环境及其体内细菌的耐药性进行了解和分析具有重要的意义。

本研究对采自阳江的香港牡蛎养殖水体和牡蛎体内的 637 株异养细菌进行了药物敏感性测试, 并对健康牡蛎和发病牡蛎体内细菌的耐药率进行了比较, 深入了解牡蛎体内外环境异养菌的耐药状况, 以期为贝类细菌性疾病预警防控及河口环境评价提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2018 年 1 月—12 月份定期至阳江的牡蛎主养区(东经: 111°73', 北纬: 21°79'), 随机分离获得 637 个菌株, 其中牡蛎养殖水体细菌 287 株(2216E 培养基, 划线法), 健康牡蛎和病牡蛎体内细菌共 350 株(营养琼脂培养基, 划线法)。健康牡蛎和病牡蛎体内菌株来源如下: 在疾病暴发阶段, 从正常养殖区(未发现异常死亡现象)和疫区(出现大量异常死亡现象)进行采样。优选正常养殖区采集健康牡蛎, 从邻近海域疫区采集病牡蛎。初步判别方法: 敲击牡蛎贝壳, 健康牡蛎会迅速闭上贝壳; 反之, 如反应迟钝、闭壳肌无力则为活力差的病牡蛎, 且在进一步的解剖过程中可见病牡蛎贝体较消瘦, 闭壳肌无力, 部分出现颜色异常情况。

具体采样情况如表 1 所示。

1.2 抗生素的选择

受试药物种类包括: 恩诺沙星、卡那霉素、庆大

表 1 2018 年不同月份采集分离出的牡蛎体内菌及水体菌优势菌株数(株)

Tab. 1 Amount of the dominant strains from oysters and the farming water samples in each month of 2018

月份	健康牡蛎体内	病牡蛎体内	水体
1	19	21	33
2(未采样)	—	—	—
3	24	—	25
4	30	19	30
5	26	—	18
6	23	—	16
7	30	28	25
8	26	—	29
9	23	—	29
10	29	—	30
11	29	—	29
12	23	—	23
总计	282	68	287

霉素、复合磺胺(甲氧苄啶/磺胺甲噁唑)、呋喃唑酮、利福平、青霉素 G、环丙沙星、四环素、氯霉素(抗生素纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司)。药敏纸片直径为 5~6 mm, 吸水量为 20 μL^[13]。同时以大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC25922 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC25923 为参考菌株进行质控, 其规格和质量要求如表 2 所示。

表 2 标准菌株纸片扩散法测定非苛养细菌抗生素药物敏感性

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

抗生素	纸片上抗生素含量	大肠杆菌 ATCC25922 /mm	金黄色葡萄球菌 ATCC25923 /mm
环丙沙星	5 μg	30~40	22~30
恩诺沙星	10 μg	28~36	22~28
庆大霉素	10 μg	19~26	19~27
卡那霉素	30 μg	17~25	19~26
复合磺胺(甲氧苄啶/磺胺甲噁唑)	1.25 μg / 23.75 μg	23~29	24~32
呋喃唑酮	300 μg	—	—
利福平	5 μg	8~10	26~34
青霉素	10 U	—	26~37
四环素	30 μg	18~25	24~30
氯霉素	30 μg	21~27	19~26

1.3 培养基

营养琼脂培养基、2216E 培养基、Mueller-Hinton 琼脂(MHA)培养基, 均购自广东环凯微生物科技公司。

1.4 方法

1.4.1 受试菌株的浓度确定及初步鉴定

菌株浓度确定: 为确定药敏试验时菌液稀释倍数, 选取生长状况良好且具有一定代表性的菌株(编号贝 11 和贝 12), 以无菌生理盐水洗脱于斜面培养基上培养了 24 h(28℃)的菌苔, 分别稀释至 10^{-6} 、 10^{-7} , 通过平板涂布法对受试菌株进行了浓度分析^[3]。

菌株初步鉴定: 煮沸法提取细菌基因组 DNA, 作为模板, 将纯培养菌液煮沸(或 100℃水浴)10 min 后立即冷却, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清为模板, 通过 PCR 技术扩增并分析保守区 16S rDNA 序列, 对所有受试菌株进行初步鉴定(到属水平), 涉及 16S rDNA 通用引物序列及反应体系、反应条件如下^[3]:

引物: 8 f: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', 1492r: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'; 反应体系 (50 μL): 水: 36.5 μL, dNTPs: 4 μL, 10×缓冲液 5 μL, Taq 酶 0.5 μL, 引物 8f 1 μL, 引物 1492r 1 μL, 模板 DNA 2 μL。

反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 2 min 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。

1.4.2 药敏试验

采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法(简称 K-B 法), 针对 10 种常见抗生素进行了药物敏感性实验, 参照 NCCLS 抗生素敏感试验标准及相关研究文献进行操作^[7, 14-17]。

1.4.3 抑菌圈的测量

使用游标卡尺测量抑菌圈的直径, 抑菌环直径判断标准如表 3 所示, 根据表 3 将药敏测试结果分别判定为 R(耐药)、I(中度敏感)、S(敏感), 分别统计各月份牡蛎养殖水体细菌、健康牡蛎体内细菌和病牡蛎体内细菌对各种抗生素的耐药率、敏感率和多重耐药率(耐受 3 种或 3 种以上药物)的菌株百分比。

2 结果

2.1 菌株浓度测试结果及受试菌株分属种类概况

根据稀释浓度要求, 用于菌悬液的浓度约为 10^8 CFU/mL, 平板涂布结果显示受试的两个菌株浓

表 3 药物敏感性判断标准

Tab. 3 Judgment standard for antimicrobial susceptibility testing

抗生素		抑菌环直径判断标准/mm		
		S	I	R
喹诺酮类	环丙沙星	≥21	16~20	≤15
	恩诺沙星	≥21	11~20	≤10
氨基糖苷类	庆大霉素	≥15	13~14	≤12
	卡那霉素	≥18	14~17	≤13
磺胺类	复合磺胺	≥16	11~15	≤10
硝基呋喃类	呋喃唑酮	≥17	15~16	≤14
利福霉素类	利福平	≥20	17~19	≤16
青霉素类	青霉素 G	≥21	11~20	≤10
四环素类	四环素	≥19	15~18	≤14
氯霉素类	氯霉素	≥18	13~17	≤12

注: S: 敏感, I: 中度敏感, R: 耐药

度约为 1.30×10^8 CFU/mL 和 2.80×10^9 CFU/mL, 表明数量级在 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL, 符合药敏测试要求^[14]。

同时, 经引物扩增后对 PCR 产物进行序列分析, 结果显示 80%受试异养菌为弧菌科 *Vibrionaceae*, 主要为弧菌属 *Vibrio*, 其次为希瓦氏菌 *Shewanella*, 其余菌属如黄单胞菌 *Xanthomonas*、芽孢杆菌 *Bacillus*、假单胞菌 *Pseudomonas* 等菌群为随机出现, 每月所占比例低于 5%。

2.2 健康牡蛎体内及其养殖水体细菌对不同抗生素的药敏测试结果

健康牡蛎体内及养殖水体异养菌对 10 种抗生素药敏测试结果如表 4 所示, 健康牡蛎体内细菌对恩诺沙星的敏感率高达 83.7%, 对庆大霉素敏感率为 83.0%, 依次对复合磺胺、四环素、环丙沙星、氯霉素敏感率在 70%以上, 而对卡那霉素、利福平、青霉素 G、呋喃唑酮敏感率在 60%以下。牡蛎养殖水体菌敏感率最高的药物是氯霉素(达 92.3%), 对恩诺沙星敏感率是 86.1%, 对环丙沙星、复合磺胺、庆大霉素的敏感率分别为 83.6%、79.8%、71.4%, 对四环素、青霉素 G、卡那霉素、利福平、呋喃唑酮敏感率在 70.0%以下。总体看, 牡蛎体内菌及水体菌对恩诺沙星耐药率最低, 分别为 1.4%和 0.7%。

2.3 病牡蛎体内细菌对 10 种抗生素的药敏测试结果

病牡蛎对 10 种抗生素的药敏测试结果见表 5, 受试菌株对庆大霉素最敏感(敏感率最高达 92.6%), 其次对复合磺胺和恩诺沙星敏感率分别为 88.2%、85.3%,

表 4 健康牡蛎体内及其养殖水体细菌对不同抗生素的敏感度(%)

Tab. 4 Sensitivity of bacteria from healthy oysters and their farming water to different antibiotics (%)

抗生素	体内菌	体内菌			水体菌		
		S	I	R	S	I	R
喹诺酮类	环丙沙星	75.2	16.7	8.2	83.6	12.2	4.2
	恩诺沙星	83.7	14.9	1.4	86.1	13.2	0.7
氨基糖苷类	庆大霉素	83.0	9.6	7.4	71.4	10.8	17.8
	卡那霉素	59.6	25.9	14.5	46.7	20.6	32.8
磺胺类	复合磺胺	78.0	6.0	16.0	79.8	6.6	13.6
硝基呋喃类	呋喃唑酮	13.8	14.9	71.3	23.0	10.5	66.6
利福霉素类	利福平	42.6	23.8	33.7	46.7	25.4	27.9
青霉素类	青霉素 G	41.8	28.4	29.8	47.7	22.3	30.0
四环素类	四环素	75.2	10.3	14.5	65.9	20.9	13.2
氯霉素类	氯霉素	74.8	19.5	5.7	92.3	6.3	1.4

注: S: 敏感, I: 中度敏感, R: 耐药

而对四环素、卡那霉素、青霉素 G、利福平等药物的敏感率低于 75.0%; 病牡蛎体内细菌对利福平、青霉素 G 耐药率则较高, 均高于 40.0%。

表 5 病牡蛎体内细菌对不同抗生素的敏感度(%)

Tab. 5 Sensitivity of bacteria from diseased oysters to different antibiotics (%)

抗生素	体内异养菌	体内异养菌		
		S	I	R
喹诺酮类	环丙沙星	75.0	19.1	5.9
	恩诺沙星	85.3	14.7	0.0
氨基糖苷类	庆大霉素	92.6	4.5	2.9
	卡那霉素	66.2	27.9	5.9
磺胺类	复合磺胺	88.2	5.9	5.9
硝基呋喃类	呋喃唑酮	5.9	17.6	76.5
利福霉素类	利福平	26.5	20.6	52.9
青霉素类	青霉素 G	42.6	10.3	47.1
四环素类	四环素	75.0	23.5	1.5
氯霉素类	氯霉素	72.1	26.5	1.5

注: S: 敏感, I: 中度敏感, R: 耐药

2.4 不同月份健康牡蛎体内细菌对 10 种抗生素的耐药率

从对 10 种抗生素的耐药率总体来看, 4 月、6—10 月、12 月健康牡蛎体内细菌耐药比例较高(图 1)。其中, 部分异养菌在 10 月份对恩诺沙星耐药率为 13.8%, 其余月份受试菌株对恩诺沙星耐药率几乎为 0; 而对利福平、呋喃唑酮和青霉素 G 耐药率明显较高, 其中异养菌对青霉素 G 最高耐药率为 73.3%; 卡那霉素、复合磺胺、四环素的耐药率在不同月份变化大。

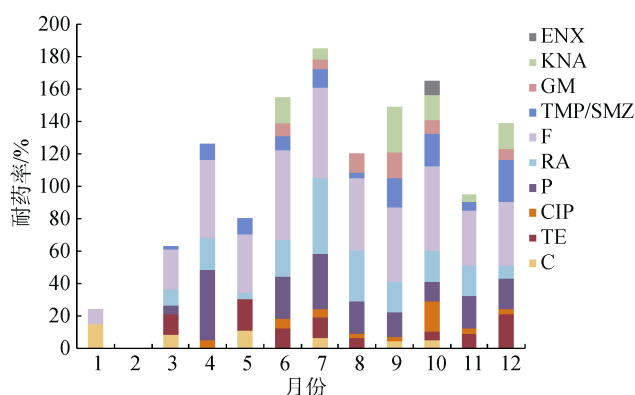


图 1 健康牡蛎体内异养菌对 10 种抗生素的耐药率

Fig. 1 Monthly antibiotic resistance rates of heterotrophic bacteria from healthy oysters to 10 antibiotics

注: CIP: 环丙沙星; ENX: 恩诺沙星; GM: 庆大霉素; KNA: 卡那霉素; TMP/SMZ: 复合磺胺; F: 呋喃唑酮; RA: 利福平; P: 青霉素; TE: 四环素; C: 氯霉素。

2.5 病牡蛎体内细菌对 10 种抗生素的耐药率

本次监测研究中, 于出现异常死亡现象的时期(分别是 1 月、4 月和 7 月)采集到病牡蛎(图 2), 受试牡蛎体内异养菌对恩诺沙星耐药性为 0, 对四环素、氯霉素、庆大霉素、环丙沙星耐药率较低。值得注意的是, 此 3 个月份的病贝体内细菌对呋喃唑酮的耐药率均较高(>50%), 对利福平和青霉素 G 的耐药率次之。本结果提示氯霉素、环丙沙星、呋喃唑酮虽已列为禁用药物, 但动物体内仍存在耐药菌, 其原因有待进一步研究确定。此外, 结果表明细菌耐药率于 7 月份达到峰值。图 2 与图 1 相比较显示, 健康牡蛎和病牡蛎体内细菌耐药总体趋势相似, 耐药情

况呈现逐渐加重趋势。

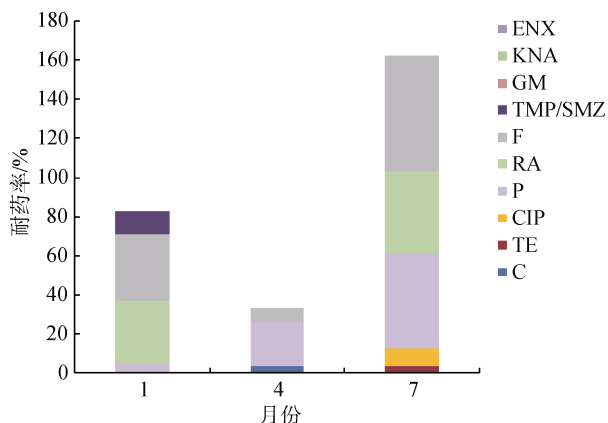


图2 病牡蛎的体内异养菌对 10 种抗生素的耐药率
Fig. 2 Monthly antibiotic resistance rates of heterotrophic bacteria from diseased oysters to 10 antibiotics

2.6 不同月份牡蛎养殖水体细菌对抗生素的耐药率

对于牡蛎养殖水体细菌(图 3), 其对恩诺沙星的耐药率几乎为零; 而对呋喃唑酮、利福平、耐药率总体上较高; 对庆大霉素、复合磺胺、环丙沙星、四环素的耐药率变化较大, 不同月份之间差异较明显。对比体内外异养菌耐药程度差异来看, 牡蛎养殖水体异养菌总体耐药状况比体内细菌的严重, 4 月份达到最高峰, 而体内菌耐药高峰出现在 7 月份。

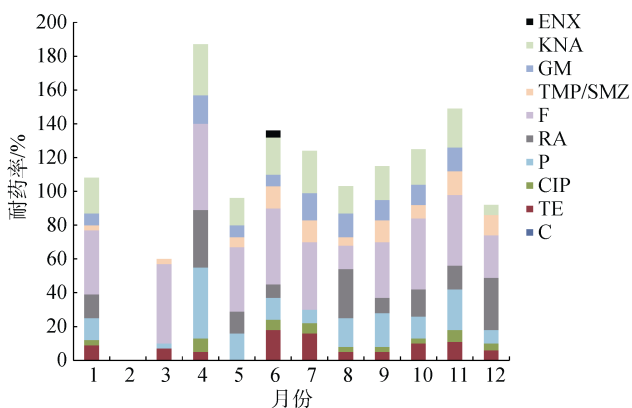


图3 牡蛎养殖水体异养菌对 10 种抗生素的耐药率
Fig. 3 Monthly antibiotic resistance rates of heterotrophic bacteria from farming water to 10 antibiotics

2.7 不同月份牡蛎体内及其养殖水体细菌的多重耐药菌株比率

统计各月及全年阳江牡蛎体内及其养殖水体细

菌多重耐药菌株比率(表 6)。总体显示, 无论是健康牡蛎体内细菌、发病牡蛎体内细菌还是养殖水体细菌, 三者的多重耐药情况均较严重, 都在 30%以上。其中发病牡蛎体内细菌多重耐药比率最高, 为 38.2%。发病牡蛎体内细菌从 1 月、4 月、7 月多重耐药菌株比例迅速上升, 7 月达到 64.7%; 健康牡蛎体内细菌多重耐药菌株比例也在 7 月份最高(66.7%); 牡蛎养殖水体细菌多重耐药菌株比例基本都在 20%以上, 其中 4 月份比率最高, 达到 76.7%。总体来看, 健康牡蛎、发病牡蛎体内细菌以及养殖水体细菌的多重耐药状况均不容忽视。综上所述, 受试菌株对 10 种抗生素中恩诺沙星的耐药率最低, 庆大霉素耐药率相对较低, 而对呋喃唑酮耐药率最高, 其次为利福平、青霉素、卡那霉素。而本次受试菌株显示较严重的多重耐药状况, 尤其牡蛎体内细菌, 且多重耐药率于 7 月份达到了最高峰。

表 6 牡蛎养殖水体及体内细菌多重耐药率(%)
Tab. 6 Percentage of multi-antibiotic resistant strains from farming water and oysters (%)

月份	健康牡蛎体内菌	病牡蛎体内菌	水体菌
1	0.0	14.3	30.3
2(未采样)	—	—	—
3	12.5	—	4.0
4	33.3	26.3	76.7
5	11.5	—	27.8
6	47.8	—	43.8
7	66.7	64.3	40.0
8	34.6	—	24.1
9	47.8	—	31.0
10	41.4	—	33.3
11	20.7	—	51.7
12	26.1	—	21.7
总计	32.3	38.2	35.5

3 分析与讨论

3.1 牡蛎养殖水体中及其体内细菌对不同抗生素的耐药差异

随着养殖业的迅速发展, 大量的抗生素和代谢物可能被释放到环境中, 这一现象被认为是病原菌进化和选择性耐药最重要的因素^[15]。而细菌耐药性可通过遗传因子水平传播, 这种传播可使菌群获得耐药性, 从而导致环境中细菌耐药状况越加严重^[18]。本研究对牡蛎养殖水体及其体内细菌耐药性进行了

分析, 受试菌株对 10 种常见抗生素的药敏测试结果显示, 牡蛎养殖水体中异养菌对氯霉素耐药率最低, 其次是喹诺酮类如恩诺沙星、环丙沙星, 其中, 氯霉素和环丙沙星作为禁用药至今已有一段时间, 提示相关耐药菌群正在逐渐消失, 可见禁用氯霉素和环丙沙星对于环境菌群的耐药性消除起到一定的积极作用, 而水体菌株对呋喃唑酮的耐药率则明显高于其他 9 种抗生素, 其原因待进一步查明。本次结果表明, 发病牡蛎及健康牡蛎体内异养菌对庆大霉素和恩诺沙星的耐药率均较低, 而受试的水体菌株及牡蛎体内菌株对青霉素和利福平的耐药率在不同月份均变化较大。值得关注的是, 在时间动态上看, 牡蛎体内细菌耐药高峰期出现于 7 月份, 而养殖水体菌的耐药高峰期出现于 4 月份, 与以往的调查研究结果^[17]一致, 4 月份水体菌多重耐药率也高于牡蛎体内菌, 且养殖水体菌总体比肠道菌耐药率高, 同时养殖水体菌耐药率与牡蛎体内细菌耐药率相比, 峰值时间提前了 3 个月。该现象提示, 环境水体中微生物通过牡蛎的滤食性与牡蛎体内微生物群不断交换, 部分菌群如弧菌等逐渐在牡蛎体内积累, 这个积累过程需要一定的时间(大约为 3 个月), 从而使得牡蛎体内菌群耐药率峰值出现于 7 月份。因此, 从耐药菌株比例角度来看, 养殖环境水体中菌群直接影响牡蛎体内菌群, 可见养殖环境质量的重要性。Starliper 等^[19]研究则表明了家畜养殖场或城市污水很可能是养殖水体或鱼体内耐药菌株的重要来源, 牡蛎养殖区多数临近人类居住地, 而对牡蛎养殖区水体及贝体内微生物的监测有助于了解人类活动对沿海区域环境生物的影响。

3.2 牡蛎体内及其养殖水体中细菌多重耐药状况

本研究发现健康牡蛎体内、发病牡蛎体内及养殖水体中的异养菌多重耐药菌株比率均约占总量的 34%。健康牡蛎体内异养菌多重耐药峰值出现于 7 月份, 达 60.0%以上, 病牡蛎体内异养菌多重耐药率与健康牡蛎体内异养菌接近; 而养殖水体异养菌多重耐药率峰值出现在 4 月份, 最高达 76.7%。可见牡蛎养殖区菌群的多重耐药状况严重, 已不容忽视。由于双壳贝类的特殊生活方式, 使其与环境的关系更为密切, 抗生素的不科学使用以及携带残留抗生素的养殖污水、城市污水的不合理排放对养殖区包括养殖贝类都会产生重大影响。其中施用抗生素是引起水生细菌产生抗性的主要原因^[20-21], 由于抗生素在

动物饲养过程中被长期低剂量使用, 会诱导部分水生细菌对相应药物产生耐药性甚至进一步产生多重耐药性, 而耐药菌一旦出现, 很可能在特定条件下通过耐药基因或耐药质粒传播耐药性^[22-24], 甚至包括部分人鱼共患病原菌, 将可能极大威胁人类健康^[25]。因此, 在养殖过程不得使用抗生素时, 应避免以下错误行为: (1) 长期反复使用同一种药物。不同菌种甚至同类菌群的不同株系对相同药物的敏感性存在差异, 如长期使用同种药物, 在药物选择压力下, 耐药菌群会逐渐成为优势种群, 最后也将导致药物完全失效^[26]。(2) 用药浓度偏低。在药源不足时, 养殖者错误地认为用比不用好, 因此在预防时期经常低剂量使用, 或者与其他药物混合使用导致可能出现拮抗作用降低药效, 而低剂量药物极易在短时间内诱导菌群对相应药物产生耐药性甚至多重耐药性。(3) 药物施用不均匀。大部分水生细菌具有回避特性, 如施用不均匀可使细菌产生耐药性的可能性增大^[27]。

4 结论

本次研究结果表明, 来源于牡蛎养殖环境水体及其体内的异养菌多重耐药比例较高, 值得引起注意。受试菌株对不同药物的抗性存在较大差异, 其中牡蛎养殖水体菌及正常体内异养菌对恩诺沙星的耐药率最低, 其次为庆大霉素; 病牡蛎体内细菌对庆大霉素的耐药率最低, 其次为复合磺胺和恩诺沙星。总体看来, 异养细菌对呋喃唑酮的耐药率明显高于对其他受测抗生素的耐药率, 而不同月份来源的菌株对青霉素和利福平的耐药率波动较大; 从时间动态上看, 水体菌耐药率峰值出现于 4 月份, 而牡蛎体内菌群耐药率峰值出现于 7 月份。

参考文献:

- [1] Yu Q Q, Niu M Y, Yu M Q, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai[J]. Food Control, 2016, 60: 263-268.
- [2] 孙兆跃, 王桃妮, 范瑞良, 等. 香港牡蛎人工繁育研究[J]. 渔业信息与战略, 2019, 34(2): 121-127. Sun Zhaoyue, Wang Taoni, Fan Ruiliang, et al. Artificial breeding of Suminoe oyster *Crassostrea ariakensis*[J]. Fishery Information and Strategy, 2019, 34(2): 121-127.
- [3] Wang R X, He J, Wang J Y. Heterotrophic bacterial abundance and diversity in the farming environment and guts of the oyster *Crassostrea hongkongensis*[J]. Journal of Shellfish Research, 2016, 35(2): 343-350.
- [4] 张占会, 张其中, 李春勇, 等. 养殖香港牡蛎致病弧菌

- 的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(6): 49-56.
Zhang Zhanhui, Zhang Zhongqi, Li Chunyong, et al. Isolation and identification of pathogenic vibrios of oyster *Crassostrea ariakensis*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2008, 27(6): 49-56.
- [5] 孟庆显, 余开康. 鱼虾贝蟹疾病诊断和防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 284-286.
Meng Qingxian, Yu Kaikang. Diagnosis and treatment of Fish, Shrimp, Shellfish and Crab Diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 284-286.
- [6] Wang H H, Schaffner D W. Antibiotic resistance: How much do we know and where do we go from here[J]. Commentary, 2011, 77(20): 7093-7095.
- [7] 王瑞旋, 徐力文, 王江勇, 等. 军曹鱼养殖水体及其体内异养细菌的耐药性研究[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(6): 588-591.
Wang Ruixuan, Xu Liwen, Wang Jiangyong, et al. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria of digestion guts isolated from cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus) farming waters[J]. Marine Environmental Science, 2008, 27(6): 588-591.
- [8] 祝玲, 蔡创华, 周毅频, 等. 九孔鲍体内及其养殖水体中异养细菌抗药性研究[J]. 海洋环境科学, 2005, 24(3): 17-20.
Zhu Ling, Cai Chuanghua, Zhou Yipin, et al. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from abalone (*Haliotis diversicolor*) farming waters and their digestion guts[J]. Marine Environmental Science, 2005, 24(3): 17-20.
- [9] 叶茂华, 柳付明, 陈秀英, 等. 丽水市贝类产品中副溶血性弧菌的血清分型及耐药性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(9): 656-658.
Ye Maohua, Liu Fuming, Chen Xiuying, et al. Serotype and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Lishui shellfish products[J]. Chinese Journal of Pathogen Biology, 2008, 3(9): 656-658.
- [10] 邓欢, 隋锡林, 王志松. 对太平洋牡蛎弧菌病的初步研究[J]. 水产科学, 1992, 11(10): 1-4.
Deng Huan, Sui Xilin, Wang Zhisong. Preliminary study on Pacific oyster vibrio disease[J]. Fisheries Science, 1992, 11(10): 1-4.
- [11] 张占会. 香港牡蛎致病微生物的筛查与鉴定[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
Zhang Zhanhui. Screening and identification pathogenic microorganisms of the oyster *Crassostrea ariakensis*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2006.
- [12] 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]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 101: 701-706.
- [13] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 202-215.
Zhang Zhuoran, Xia Mengyan, Ni Yuxing. The basis and clinic of microbial antibiotic resistance[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 202-215.
- [14] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline, second edition (M45-A2)[S]. Wayne, Pa, USA, 2010.
- [15] 胡继红, 高振翔, 尹铭芳. 美国 NCCLS 2002 年版抗生素药敏试验操作标准更新内容[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(6): 367-369.
Hu Jihong, Gao Zhengxiang, Yin Minfang. American NCCLS 2002 edition antibiotic sensitivity test operation standard update content[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2002, 25(6): 367-369.
- [16] 谭瑶, 赵清, 舒为群, 等. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2292-2293.
Tan Yao, Zhao Qing, Shu Weiqun, et al. Antibiotic sensitivity test by k-b disk diffusion method[J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2010, 7(20): 2292-2293.
- [17] Wang R X, Wang A L, Wang J Y. Antibiotic resistance monitoring in heterotrophic bacteria from anthropogenic-polluted seawater and the intestines of oyster *Crassostrea hongkongensis*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 109: 27-31.
- [18] Chen H Y, Chen R H, Jing L J, et al. A metagenomic analysis framework for characterization of antibiotic resistomes in river environment: Application to an urban river in Beijing[J]. Environmental Pollution, 2019, 245: 398-407.
- [19] Starliper C E, Cooper R K, Shotts E B. Plasmid-mediated romet resistance of *Edwardsiella ictaluri*[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1993, 5: 1-8.
- [20] Danner M C, Robertson A, Beheends V, et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects[J]. Science of the Total Environment, 2019, 664: 793-804.
- [21] World Health Organization. Antimicrobial Resistance. 2014. <http://www.searo.who.int/thailand/factsheets/fs0023/en/>
- [22] Allen H K, Donato J, Wang H H, et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8: 251-259.
- [23] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [24] 王瑞旋, 耿玉静, 冯娟, 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.
Wang Ruixuan, Geng Yujing, Feng Juan, et al. Identification and analysis of resistant plasmid of pathogenic

- bacteria *Vibrio harveyi* isolated from *Haliotis diversicolor*[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(2): 1-6.
- [25] 王瑞旋, 耿玉静, 王江勇, 等. 水产致病菌耐药基因的研究[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(3): 323-328.
Wang Ruixuan, Geng Yujing, Wang Jiangyong, et al. Antibiotic resistant genes in aquacultural bacteria[J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(3): 323-328.
- [26] Lu J, Jin M, Nguyen S H, et al. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation[J]. Environment International, 2018, 118: 257-265.
- [27] 张曰亮, 牛立国, 王淑华. 谈水产养殖病原体形成耐药性的原因、后果及对策[J]. 黑龙江水产, 2007, (4): 47-48.
Zhang Yueliang, Niu Liguang, Wang Shuhua. The causes, consequences and countermeasures of the formation of antibiotic resistance to pathogens in aquaculture[J]. Fisheries of Heilongjiang, 2007, (4): 47-48.

Study on antibiotic resistance of bacteria in oysters and their farming water

WANG Rui-xuan¹, LI Bing², LIN Hua-jian³, CHEN Qi⁴, CHEN Xiu-cheng^{2, 5},
MOU Hong-li², WANG Jiang-yong²

(1. Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 511400, China; 4. South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 5. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Received: Dec. 10, 2019

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; heterotrophic bacteria; *Vibrio*; antibiotics; resistance

Abstract: To understand the resistance to antibiotics of bacteria in and out of oysters, 10 types of antibiotic susceptibility tests were performed on 637 heterotrophic bacteria isolated from oysters and their farming water in Yangjiang. The Kirby-Bauer paper diffusion method (K-B method) was used to analyze the general situation of bacterial resistance to different antibiotics according to the NCCLS antibiotic sensitivity test operating standards. The results showed that the antibiotic resistance rates of heterotrophic bacteria from healthy oysters to enoxacin and gentamicin were low. The antibiotic resistance rate for heterotrophic bacteria from diseased oysters to gentamicin was the lowest, followed by that to the compounds sulfonamide and enoxacin. The antibiotic resistance rates for bacteria from farming water to chloramphenicol, enoxacin, and ciprofloxacin were low; however, the antibiotic resistance rate of bacteria from oysters and farming water to furazolidone was the highest among 10 tested antibiotics, and the sensitivity rates to kanamycin and penicillin were fickle. The present results also suggested that the multi-antibiotic resistance rate was significant. The multi-antibiotic resistance rate of strains from healthy oysters and diseased oysters peaked at 66.7% and 64.3%, respectively, in July, and the multi-antibiotic resistance rate of the strains from the farming water peaked at 76.7% in April. In general, the results of this study indicated that the multi-antibiotic resistance rate of heterotrophic bacteria from the farming environmental water and oysters were all high, which should be a concern. The resistance of the tested strains to different antibiotics varied significantly, and the resistance rate to furazolidone was significantly higher than that of other tested antibiotics. In terms of time dynamics, the peak of antibiotics resistance rate of farming water-derived bacteria and oyster-derived bacteria occurred in April and July, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)