

# 皱纹盘鲍脓疱病原菌——河流弧菌—II 的抗药机制的初步研究\*

李太武 丁明进 宋协民

(辽宁师范大学生物系, 大连 116029) (大连水产养殖公司, 大连 116023)

相建海 刘瑞玉

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 1993年9月至1995年末, 大连地区的一龄鲍至成鲍都出现了脓疱病, 用常规方法从3个养殖厂的病鲍中分离到了3个菌株, 分别为D株、N株和T株。经鉴定这3个菌株为同一种——河流弧菌—II。这3个菌株来自3个不同的海区、不同的单位, 并且这3个单位使用的抗生素种类和浓度也不同, 所以这3个菌株对18种抗生素的敏感度也不同。D株对环丙沙星(抑菌环直径30mm)、复方新诺明(抑菌环直径27mm)等敏感, 而对青霉素、青霉素II、氨苄青霉素(抑菌环直径0mm)等耐药。N株除对青霉素II、白霉素、吡哌酸等耐药外, 对其它12种抗生素都敏感或中度敏感(抑菌环直径13.5—30mm)。T株对氟派酸(抑菌环直径22mm)、环丙沙星(抑菌环直径20.3mm)等敏感, 而对氯霉素、复方新诺明等耐药。研究发现, 经常使用同一种抗生素很容易使病原菌产生耐药性, 连续3d使用单一的抗生素(青霉素)就会产生耐药的菌株。为证明上述3个菌株的抗药性是属于哪一类, 以T株为例, 提取总DNA, 并对总DNA进行EcoRI酶切图谱分析, 图谱有明显的异同, 说明3个菌株的抗药性不同可能与基因突变有关。不管是非遗传型还是遗传型, 都是由于抗生素为细菌提供了耐药突变株的选择环境, 从而使耐药菌株得以大量繁殖。

**关键词** 皱纹盘鲍 河流弧菌—II 脓疱病 抗药机制

鲍类病害的研究报道不多(孟庆显, 1988), 引起鲍类大批死亡的病因各异, 有细菌性的(Elston et al., 1983), 有寄生虫感染所致的(Bower et al., 1989 a, b), 也有附着敌害生物造成的间接死亡(夏福祖, 1992)等等。但弧菌抗药的机制至今未见报道。从1990年以来, 养殖的皱纹盘鲍出现了大批死亡的现象。从稚鲍(鲍苗)发生“暴死”, 发展到一龄鲍至成鲍也大批死亡。不仅是养殖的, 天然的鲍也同样未能幸免。稚鲍的死亡, 主要是由于食性的不适转变引起的(李太武等, 1995a, b)。一龄至成鲍、亲鲍的死亡主要是脓疱病所致, 而脓疱病是由河流弧菌—II (*Vibrio fluvialis*—II)引起的(刘金屏等, 1995; 聂丽萍等, 1995), 用抗生素可以有效地杀死该弧菌。本文为河流弧菌

\*大连市科委重大资助项目, 1994年44号。李太武, 男, 出生于1955年12月, 副教授。

收稿日期: 1996年2月11日, 接受日期: 1996年7月6日。

— II 抗药机制的初步探讨, 以期为使用抗生素、减少污染、降低成本提供一些数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用病鲍(*Haliotis discus Hannai*)于1993年9月, 1995年12月取自大连水产养殖公司、大连新港养殖公司、太平洋海珍品养殖公司, 壳长为3—8cm。病原菌的分离: 用无菌水冲洗病鲍3—4次, 70%酒精擦洗后, 用灭菌的解剖器解剖取出足(含病灶)、外套膜、消化管、肝脏等器官, 无菌水冲洗后匀浆, 然后用液体稀释法按10倍稀释后, 接种在下述的培养基上, 26—37℃培养(恒温)2—3d后观察记录菌落形态, 挑取优势单菌落, 利用液体稀释法纯化后接入牛肉浸汤琼脂斜面, 冷冻干燥保存。从3个单位病鲍分离到的病原菌均为河流弧菌—II(*Vibrio fluvialis*—II), 分别为D株、N株、T株。

### 1.2 方法

**1.2.1 病原菌对18种抗生素的敏感试验** 培养基, MH(Mueller-Hinton)肉汤和MH琼脂(其中水改用海水, 测定磺胺类药物时不加胨)。菌液, 纸片扩散法按Kirby-Bauer法要求制备。试管稀释法用菌液, 是先取1环已纯化的试验菌接种于1ml MH肉汤培养基中, 于37℃培养6h(菌液浓度为 $9 \times 10^8$  cell/ml), 再用MH肉汤按1:1000稀释备用。以上述3种菌株为代表菌株。

固体抗生素稀释液: 青霉素, 0.1mol/L, pH=6.5磷酸缓冲液; 氨苄青霉素, 0.1mol/L, pH=8.0磷酸缓冲液; 庆大霉素, 无菌蒸馏水; 红霉素, 70%乙醇; 痢特灵, 70%乙醇。

用Kirby-Bauer纸片扩散法(李影林, 1989)测定病原菌对18种抗菌药物的敏感度(对照标准菌株为大肠埃希氏菌ATCC 25922)。结果判定是量取各药物的抑菌环直径后, 按Kirby-Bauer方法的解释标准确定敏感、中度敏感、耐药的药物。药敏纸片购自大连大学医学院专科学校。根据敏感度测定结果, 选择8种敏感药物和1种中度敏感药物, 用试管两倍稀释法测定其最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)(张颖悟等, 1990)。

**1.2.2 抗青霉素菌株的敏感试验** 选取腹足上具明显脓疱的成鲍(仅上足对刺激有反应, 接近死亡), 足浅表肌肉注射青霉素, 0.5万单位/g(g为体重, 下同), 每天注射一次, 共注射7天。从第8天开始, 用 $6.5 \times 10^{-6}$ 青霉素浸泡, 浸泡4天, 每天1次15mm。取注射和浸泡后第3, 5, 7, 9和11天的病鲍, 按上述方法分离病原菌及做抗生素敏感试验。取未经注射或浸泡的病鲍作为对照, 也分别在第3, 5, 7, 9和11天取出病鲍并同样做分离病原菌等试验。

**1.2.3 3个病原菌株总DNA的EcoR I酶切图谱分析** 总DNA的提取按下述步骤进行。(1)挑取T菌株的单菌落, 接入2ml前述液体培养基中, 37℃过夜。将这2ml扩增的菌液接种于50ml同样的液体培养基中, 37℃过夜。取500ml液体培养基, 预温到37℃, 将50ml菌液全部接入这500ml培养基中, 37℃, 过夜。(2)用500ml离心管, 于4℃, 4500r/min离心15min, 弃上清。(3)加入20ml TEN(5mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA, 200mmol/L NaCl, pH=9.0)和RNase(100μg/ml), 混合均匀,

加入 10mg 蛋白酶 K 粉末, 温和使之溶解并混匀, 加入 2ml 10% SDS, 将离心管颠倒几次, 并继续轻摇 10min。(4) 于 55℃ 保温 2—4h, 其间不时地轻摇。(5) 当细菌充分消解后, 加入等体积 Tris-HCl 饱和酚, 温和颠倒离心管, 使两相充分混合。(6) 室温 (20℃), 10 000r/min 离心 10min, 使混合液清晰分相。(7) 用大口吸管将上层水相转至另一只离心管中, 弃去界面和酚相。(8) 将步骤(5) — (7) 重复几次, 直至中间相完全消失。(9) 将上清转至另一离心管中, 加入 3mol/L NaAc(醋酸钠) 溶液, pH=4.0, 使其终浓度为 0.3mol/L, 再加入 0.8 体积的异丙醇, 温和混匀。(10) 用玻璃钩钩出纤维状的 DNA, 干燥后, 在 2—5ml TE 中完全溶解。测 OD<sub>260</sub> 计算浓度。

EcoR I 酶切图谱制备: 样品, 10 $\mu$ l (含 4 $\mu$ g); EcoR I, 1 $\mu$ l (20U/ $\mu$ l); 10 $\times$ L Buffer, 2 $\mu$ l; 无菌水, 7 $\mu$ l; 总体积 20 $\mu$ l; 37℃ 保温 1—2h。电泳: 琼脂糖 1%, 1g 琼脂糖溶于 100ml TAE 中。酶切样品, 20 $\mu$ l; TAE, 4 $\mu$ l; Loading Buffer, 1 $\mu$ l; 60—70V 稳压电泳 1.5—2h。EB 染色, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 3个病原菌株对 18种抗生素的敏感度、最低抑菌浓度和最低杀菌浓度结果

2.2.1 D, N, T3 个菌株对 18 种抗生素的敏感度见表 1。结果可见, D, N, T3 个菌株虽然是同一种弧菌, 但由于分离自不同海区和养殖单位, 并且这 3 个单位使用抗生素的种类和浓度的背景不同, 因而这 3 个菌株的抗药性也不同。以氯霉素为例, 大连水产养殖公司在 1993 年曾使用过, 故 D 株对其敏感度不高, 而太平洋海珍品养殖公司在 1994, 1995 年都大量使用氯霉素药浴, 因此 T 株已对氯霉素耐药。

2.1.2 9种抗生素对 T 菌株的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度 根据上述敏感度结果, 以太平洋海珍品养殖公司的病原菌(T) 为代表, 选出敏感和中度敏感的药物 9 种, 进行 MIC 和 MBC 的研究, 结果如表 2。可以看出: MIC 值和 MBC 值最低的药物是新生产的环丙沙星, 仅需 0.31 $\mu$ g/ml, 0.63 $\mu$ g/ml; 其次是氨苄青霉素和青霉素(分别为 0.78, 1.56 $\mu$ g/ml; 1.25, 2.5 $\mu$ g/ml)

### 2.2 抗青霉素菌株(T) 的药物敏感试验结果

在用青霉素做药敏试验的过程中, 出现了菌落透明度的变化。从药物(青霉素)处理 3, 5, 7d 的病鲍体内分出的菌落有两种, 1 种菌落不透明, 数量较多; 另 1 种菌落的周边透明而中央不透明, 这种菌落数量较少(半透明菌落)。从处理 9, 11d 的病鲍体内分出 4 种菌落, 第一种为不透明菌落, 数量较少; 第二种是半透明的菌落, 数量较多; 第三种是整个菌落都透明, 不仔细观察看不清楚它们的位置(全透明), 数量最多; 第四种菌落也不透明(同第一种), 但菌落的边缘出现许多缺刻, 数量较少。对照组对其前后 5 次分离出的菌落只有 1 种, 其透明度没有变化(不透明)。为了研究透明度的变化与抗药性的关系, 又用 16 种抗生素研究了处理 9, 11d 所出现的前 3 种菌落的敏感度, 结果如表 3。可以看出, 随着菌落透明度的增加, 其耐药性发生了很大的变化, 有的敏感度大幅度增加(如环丙沙星、庆大霉素、痢特灵等), 有的由原来的敏感和中度敏感变为耐药(如青霉素、头孢菌素、氨苄青霉素等), 有的由耐药一变而为非常敏感(复方新诺明)或敏感(链霉素)等等。

### 2.3 D, N, T3 个菌株总 DNA 的 EcoR I 酶切图谱分析结果

表 1 D, N, T3个菌株的药物敏感试验结果  
Tab.1 The drug sensitivity tests of D, N, T strains

|             | 药 物    | 纸片含药量( $\mu\text{g}$ ) | 抑菌环直径(mm) | 敏感度 |
|-------------|--------|------------------------|-----------|-----|
| D<br>菌<br>株 | 环丙沙星   | 10                     | 30.0      | S   |
|             | 复方新诺明  | 25                     | 27.0      | S   |
|             | 痢特灵    | 5                      | 26.0      | S   |
|             | 氟哌酸    | 10                     | 25.0      | S   |
|             | 氯霉素    | 10                     | 20.0      | S   |
|             | 庆大霉素   | 10                     | 20.0      | S   |
|             | 红霉素    | 15                     | 20.0      | S   |
|             | 卡那霉素   | 10                     | 14.0      | MS  |
|             | 吡哌酸    | 10                     | 12.0      | R   |
|             | 丁胺卡那霉素 | 30                     | 8.0       | R   |
|             | 链霉素    | 10                     | 7.0       | R   |
|             | 氨苄青霉素  | 10                     | 0         | R   |
|             | 青霉素    | 10                     | 0         | R   |
|             | 头孢菌素   | 30                     | 0         | R   |
|             | 土霉素    | 10                     | 0         | R   |
|             | 先锋霉素   | 30                     | 0         | R   |
|             | 白霉素    | 20                     | 0         | R   |
| 青霉素 II      | 10     | 0                      | R         |     |
| N<br>菌<br>株 | 氯霉素    | 10                     | 30.0      | S   |
|             | 复方新诺明  | 25                     | 25.5      | S   |
|             | 环丙沙星   | 10                     | 21.5      | S   |
|             | 氟哌酸    | 10                     | 20.0      | S   |
|             | 庆大霉素   | 10                     | 19.0      | S   |
|             | 痢特灵    | 5                      | 19.0      | S   |
|             | 氨苄青霉素  | 10                     | 17.5      | S   |
|             | 卡那霉素   | 10                     | 17.0      | MS  |
|             | 青霉素    | 10                     | 16.0      | MS  |
|             | 丁胺卡那霉素 | 30                     | 15.0      | MS  |
|             | 红霉素    | 15                     | 14.0      | MS  |
|             | 土霉素    | 10                     | 13.5      | MS  |
|             | 先锋霉素   | 30                     | 11.5      | R   |
|             | 链霉素    | 10                     | 11.0      | R   |
|             | 头孢菌素   | 30                     | 0         | R   |
|             | 白霉素    | 20                     | 0         | R   |
|             | 青霉素 II | 10                     | 0         | R   |
| 吡哌酸         | 10     | 0                      | R         |     |
| T<br>菌<br>株 | 氟哌酸    | 10                     | 22.0      | S   |
|             | 环丙沙星   | 10                     | 20.3      | S   |
|             | 庆大霉素   | 10                     | 19.3      | S   |
|             | 青霉素    | 10                     | 19.3      | S   |
|             | 红霉素    | 15                     | 18.7      | S   |
|             | 痢特灵    | 5                      | 18.5      | S   |
|             | 头孢菌素   | 30                     | 18.0      | S   |
|             | 卡那霉素   | 10                     | 17.7      | S   |
|             | 先锋霉素   | 30                     | 16.0      | S   |
|             | 氨苄青霉素  | 10                     | 15.0      | MS  |
|             | 丁胺卡那霉素 | 30                     | 14.0      | R   |
|             | 复方新诺明  | 25                     | 0         | R   |
|             | 氯霉素    | 10                     | 0         | R   |
|             | 链霉素    | 10                     | 0         | R   |
|             | 土霉素    | 10                     | 0         | R   |
|             | 白霉素    | 20                     | 0         | R   |
|             | 青霉素 II | 10                     | 0         | R   |
| 吡哌酸         | 10     | 0                      | R         |     |

S: 敏感, Sensitivity; MS: 中度敏感, Moderate Sensitivity; R: 耐药, Resistant.

表2 9种抗生素对T菌株的MIC和MBC值

Tab.2 The MIC and MBC values of nine antibiotics on T strain

| 药物名称        | 药物浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |    |     |      |      |      |      |      |      |      |      | 对照 | MIC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | MBC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-------------|---------------------------|----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|----|-----------------------------|-----------------------------|
|             | 100                       | 50 | 25  | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.19 | 0.09 |    |                             |                             |
| 氨苄青霉素       | -                         | -  | -   | -    | -    | -    | -    | -    | +    | +    | +    | +  | 0.78                        | 1.56                        |
| 庆大霉素        | -                         | -  | -   | -    | -    | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 3.12                        | 6.25                        |
| 痢特灵         | -                         | -  | -   | -    | -    | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 3.12                        | 6.25                        |
| 红霉素         | -                         | -  | -   | -    | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 6.25                        | 12.5                        |
| 卡那霉素        | -                         | -  | -   | -    | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 6.25                        | 12.5                        |
| 头孢菌素        | -                         | -  | -   | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 12.5                        | 25.0                        |
| 丁胺卡那霉素      | -                         | -  | -   | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 12.5                        | 25.0                        |
| 环丙沙星<br>青霉素 | 10                        | 5  | 2.5 | 1.25 | 0.63 | 0.31 | 0.16 | 0.08 | 0.04 | 0.02 | 0.01 |    |                             |                             |
|             | -                         | -  | -   | -    | -    | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 0.31                        | 0.63                        |
|             | -                         | -  | -   | -    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | 1.25                        | 2.5                         |

+ 表示有菌生长; - 表示无菌生长; 对照, 不加药物。

表3 抗青霉素菌株(T)对16种抗生素的药物敏感试验结果

Tab.3 The sensitivity tests of T strains resistant to 16 kinds of antibiotics after treating by Penicillin

| 药物    | 不透明菌落(原菌落)    |     | 半透明菌落         |     | 全透明菌落         |     | 对照<br>(T菌株药敏<br>试验的抑菌<br>环直径 mm) |
|-------|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|----------------------------------|
|       | 抑菌环直径<br>(mm) | 敏感度 | 抑菌环直径<br>(mm) | 敏感度 | 抑菌环直径<br>(mm) | 敏感度 |                                  |
| 环丙沙星  | 20.3          | S   | 22.3          | S   | 27.5          | S   | 20.3                             |
| 青霉素   | 19.3          | S   | 20.3          | S   | 0             | R   | 19.3                             |
| 庆大霉素  | 19.3          | S   | 20.0          | S   | 22.0          | S   | 19.3                             |
| 红霉素   | 18.7          | S   | 18.0          | S   | 18.8          | S   | 18.7                             |
| 痢特灵   | 18.5          | S   | 16.0          | MS  | 22.0          | S   | 18.5                             |
| 头孢菌素  | 18.0          | S   | 17.5          | MS  | 13.7          | R   | 18.0                             |
| 卡那霉素  | 17.7          | S   | 15.7          | MS  | 17.3          | MS  | 17.7                             |
| 先锋霉素  | 16.0          | MS  | 16.0          | MS  | 14.3          | MS  | 16.0                             |
| 氨苄青霉素 | 15.0          | MS  | 15.7          | MS  | 0             | R   | 15.0                             |
| 白霉素   | 0             | R   | 0             | R   | 0             | R   | 0                                |
| 氯霉素   | 0             | R   | 0             | R   | 0             | R   | 0                                |
| 青霉素II | 0             | R   | 0             | R   | 0             | R   | 0                                |
| 吡哌酸   | 0             | R   | 0             | R   | 0             | R   | 0                                |
| 复方新诺明 | 0             | R   | 0             | R   | 32.7          | S   | 0                                |
| 链霉素   | 0             | R   | 11.0          | R   | 17.0          | S   | 0                                |
| 土霉素   | 0             | R   | 0             | R   | 0             | R   | 0                                |

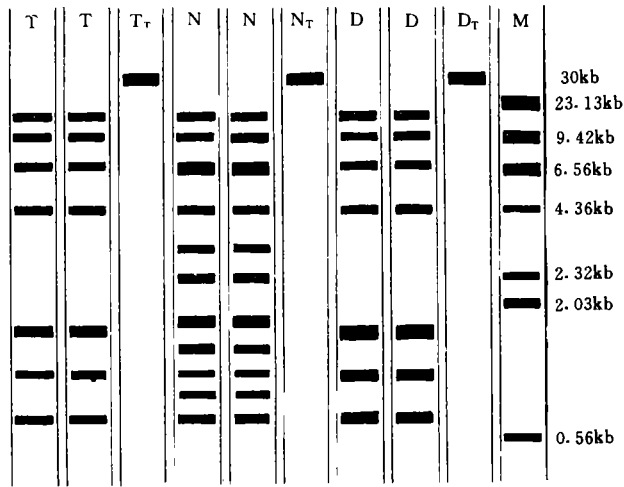


图1 D, N, T3个菌株总DNA EcoR I 酶切模式图

Fig.1 The illustration of Total DNA of D, N and T strains digested by EcoR I

M, 标准样; D<sub>r</sub>, D株总DNA; D, D株酶切样品; N<sub>r</sub>, N株总DNA; N, N株酶切样品; T<sub>r</sub>, T株总DNA; T, T株酶切样品。

使用简单而且能马上见效。目前普遍采用氯霉素、土霉素等。由于超量、连续使用单一的抗生素,使细菌产生了严重的抗药性。在研究中发现,大连水产养殖公司开始使用的抗生素剂量小,不是连续大剂量的使用,所以分离出的病原菌抗青霉素、青霉素Ⅱ、氨苄青霉素、头孢菌素、白霉素、先锋霉素等,而对氯霉素敏感。所以在剥离后的初期,用6.5μg/ml氯霉素药浴可以明显降低稚鲍的死亡率,但随着使用时间的延长,效果逐渐减弱。原来药浴1次可以停几天,后来加大药量,间隔时间也要缩短仍然不能完全控制病情,只好在用药的同时,也减少饵料量和饵料在水中停留时间,才能暂时稳定了稚鲍的“暴死”。

太平洋海珍品养殖公司的亲鲍促熟是深池笼式集中养殖,数量多,密度大。又由于鲍喜集堆,所以很难及时发现病鲍和死鲍,等发现时死亡之数已很多了。用氯霉素处理3次,没有效果。分离出病原菌测药敏感度时发现,从这一海区分离出来的病原菌(脓疱病菌)抗氯霉素、白霉素、链霉素、青霉素Ⅱ、复方新诺明、土霉素、吡哌酸等,而对环丙沙星等敏感。亲鲍足上的脓疱越来越多,病灶深,脓汁多,最后鲍的所有组织器官内都有河流弧菌-Ⅱ存在,它的传播是通过血淋巴进行的。

大连新港养殖公司是靠天然海水养殖,未使用抗生素,所以此海区的病原菌(河流弧菌-Ⅱ)只抗青霉素Ⅱ、白霉素、吡哌酸,而土霉素在此却是中度敏感。

从上述几个养殖单位,几个不同海区分离得到的河流弧菌-Ⅱ对抗生素的敏感度各异,并且只要连续用一种抗生素(如青霉素)处理病原菌就会产生抗药性;不仅抗这一种抗生素,原来它对其它抗生素的敏感度也发生很大的变化,原来敏感的变成了抗性的,

提出这3个菌株的总DNA,然后用EcoR I核酸内切酶酶切4h,结果发现3个菌株的酶切图谱异同明显。相同之处:3个菌株的总DNA约长为30kb。酶切后,3个菌株的大多数条带都是相同的,只不过有的带清楚,有的带模糊。不同之处:D株和T株在23.1—2.3kb处有4条带,不明显,而N株在此区间有6条带,第3条带明显。在2.0—0.56kb区间内,D, T只有明显的3条带,而N有5条之多,而且十分明显(见图1)。

### 3 讨论与结语

#### 3.1 科学使用抗生素

抗生素是目前海水养殖中用于疾病防治的一种主要药物,它

原来抗性的变为非常敏感的等等。在研究中还发现,有些抗生素的作用一样,如青霉素和氨苄青霉素、头孢菌素等,如果对其中的一种敏感,其它两种肯定也敏感,否则,如果对其中的一种有抗性,则对其余两种一定也有抗性。所以在使用抗生素时,应该注意下列几点:

(1)要经常检测优势致病菌对抗生素的敏感性,这样可以保证对症下药,既节约经费,又防止污染。搞清敏感性之后,再确定该药的 MIC 和 MBC。

(2)不要长时间使用单一的抗生素,要对两种有累加作用的抗生素配合或交替使用,以避免抗药菌株的产生。

(3)亲鲍在促熟和养殖过程中,要密度合理,尽量不用大笼式养殖,因为这样易于发现病鲍并将其及时隔离,从而避免造成交叉感染,得病的机会大大减少,会明显提高成活率。

**3.2 河流弧菌 - II 抗药性的类型**,实验初步证明 D, N, T3 个菌株的抗药性均属遗传型。EcoR I 酶谱的不同,说明 3 个菌株的基因发生了突变,而这种突变是由于抗生素为其提供了耐药突变株的选择环境,从而使耐药菌株得以大量繁殖。

### 参 考 文 献

- 刘金屏等, 1995. 中国水产科学, 2(2): 78 — 84.
- 李太武等, 1995 a. 海洋科学, 1: 52 — 57.
- 李太武等, 1995 b. 水产科学, 14(5): 3 — 7.
- 李影林, 1989. 临床医学检验手册, 吉林科学技术出版社(长春), 526 — 535.
- 张颖悟等, 1990. 临床微生物学(上,下), 大连出版社(大连), 40 — 49(上); 640 — 661(下).
- 孟庆显, 1988. 海洋湖沼通报, 1: 47 — 49.
- 聂丽平等, 1995. 中国微生态学杂志, 7(1): 33 — 36.
- 夏福祖, 1992. 水产科学, 11(6): 23 — 24.
- Bower, S. M., 1989. *Aquaculture*, 78: 207 — 215.
- Bower, S. M., Whitaker, D. J., Voltolina, D., 1989. *Aquaculture*, 78: 147 — 152.
- Elston, R. A. et al., 1983. *J. Fish Disease*, 6: 111 — 128.

## PRELIMINARY STUDIES ON THE MECHANISM OF *VIBRIO FLUVIALIS*— II RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

Li Taiwu, Ding Mingjin<sup>†</sup>, Song Xiemin<sup>†</sup>, Xiang Jianhai<sup>\*\*</sup>, Liu Ruiyu<sup>\*\*</sup>

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

<sup>†</sup>(Aquacultural Company of Dalian, Dalian 116023)

<sup>\*\*</sup>(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** The 1993 to 1995 outbreak of pustule disease of abalone *Haliotis discus* Hannai, discovered in the Dalian Coast (Aquacultural Company of Dalian, Pacific Aquacultural Company, New Harbor Aquacultural Company of Dalian) was caused by three strains (D, N and T) of the bacteria species *Vibrio fluvialis*— II, and were isolated with the routine method from the abalone foot. In this work, the sensitivity of *V. fluvialis*— II to 18 kinds of antibiotics and their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were studied. The sensitivity of *V. fluvialis*— II was determined by using drugpaper to inhibit proliferation of the bacteria and then the diameter of the ring for bacteria inhibition was measured. The results showed that different strains have different sensitivity. The D strain (isolated from the diseased abalone of the Aquacultural Company of Dalian) was sensitive to Ciprofloxacin [the diameter of ring for bacteria inhibition (DRBI) was 30.0mm], Cotrimoxazole (DRBI was 27.0mm), Furazolidone (DRBI was 26.0mm), Norfloxacin (DRBI was 25.0mm), and Chloramphenicol (DRBI was 20.0mm), Gentamicin (DRBI was 20.0mm), Erythromycin (DRBI was 20.0mm); and resistant to Ampicillin, Penicillin and Cephalosporin (DRBI was 0mm). The N strain (isolated from the diseased abalone of the New Harbor Aquacultural Company of Dalian) was sensitive and moderately sensitive to the 12 kinds of antibiotics, including Chloramphenicol (DRBI was 30.0mm), Cotrimoxazole (DRBI was 25.5mm), Ciprofloxacin (DRBI was 21.5mm), Norfloxacin (DRBI was 20.0mm), Gentamicin (DRBI was 19.0mm), Furazolidone (DRBI was 19.0mm); and resistant to Cefoperazone, Streptomycin, Cephalosporin, Leucomycin, Pipemidic Acid and Penicillin II. The T strain (isolated from the diseased abalone of the Pacific Aquacultural Company) was sensitive to Norfloxacin (DRBI was 22.0mm), Ciprofloxacin (DRBI was 20.3mm), Gentamicin (DRBI was 19.3mm), Penicillin (DRBI was 19.3mm), Erythromycin (DRBI was 18.7mm); and resistant to Cotrimoxazole, Chloramphenicol, Methacycline (DRBI was 0mm). The MIC and MBC test of the T strain was performed by using 9 kinds of antibiotics dilution. The results showed that



for Ciprofloxacin MIC was  $0.31\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $0.63\mu\text{g}/\text{ml}$ ; for Ampicillin MIC was  $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ ; for Penicillin MIC was  $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ; for Gentamicin MIC was  $3.12\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ ; for Furazolidone MIC was  $3.12\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ ; for Erythromycin MIC was  $6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ , MBC was  $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ . The sensitivity was changed along with the transparency of the bacteria colony by treatment of the diseased abalone with Penicillin for 11 days. The mechanism of resistance of *V. fluvialis*-Ⅱ was studied by gene engineering. The total DNA of the three strains was extracted and digested by Restriction Enzymes EcoR I. Electrophoresis showed that the three strains had many different bands.

The above results suggested that the mechanism of resistance of *V. fluvialis*-Ⅱ was related to gene mutation, and that antibiotics provided necessary condition for the bacteria resistance.

**Key words** *Haliotis discus Hannai* *Vibrio fluvialis*-Ⅱ Pustule disease  
Mechanism of resistance to antibiotics