

水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性

李爱华

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:目前, 抗菌药物在水产养殖动物疾病防治中占有重要地位, 然而, 在水产养殖中使用抗菌药物也可产生一系列的副作用, 例如细菌耐药性的产生和药物在鱼体和环境中的残留。本文就水产药物使用的历史、现状、适应症、副作用, 耐药性的现状、来源、产生机制, 耐药菌判定的标准, 以及该领域的研究现状等问题进行综述与分析, 以便为合理使用抗菌药物提供理论依据。

关键词:鱼类病原菌; 抗菌药; 耐药性

中图分类号: S948

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)01-0087-05

自1945年磺胺药成功地应用于治疗鳟鱼疝疮病以来, 氯霉素、土霉素、卡那霉素、硝呋啶、噻唑酸、氟甲喹等相继在鱼类中应用^[1], 化学治疗成为防治细菌性鱼病的重要手段。但目前渔用抗菌药物使用的范围和剂量日益增大, 养殖水体病原菌抗药性问题日趋严重, 由此引起的鱼病频发, 给水产养殖带来极大灾难。本文对目前养殖水体的抗菌药物使用情况加以综述, 旨在合理使用渔药、减少药物滥用提供借鉴。

1 渔用抗菌药物

1.1 药物种类

目前, 至少在1个国家获得使用许可的渔用抗菌药物有^[2]: 阿莫西林(AM), 氨基青霉素(AMP), 氯霉素(CM), 金霉素(Chlortetracycline), 硫酸多粘菌素(Colistin sulphate), 强力霉素(Doxycycline), 恩诺沙星(Enrofloxacin), 氟派酸(Norfloxacin), 红霉素(EM), 氟甲喹(Flumequine), 呋喃唑酮(NF), 交沙霉素(Josamycin), 林肯霉素(Lincomycin), 二噻唑酮酸(Miloxacin), 萘啶酸(NA), 呋喃唑啉(Nifurprazine), 噻唑酸(OA), 四环素(TC), 土霉素(OTC), 吡咯酸(PA), 新霉素钠(Sodium novobiocin), 螺旋霉素(Spiramycin), 磺胺类药物(SA), 三甲氧苄氨嘧啶(TMP), Sodium nifursytinate, Alkyltrimethylammonium, Florfenicol, Kitasamycin 及 Ormetoprim 等。其中多数只在日本获得使用许可, 而欧美国家批准

的药物非常少, 而且每种药物都有其特定的目标动物。例如在日本盐酸土霉素可用于鲤鱼和香鱼(ayu), 但不允许用于鳗鲡和虹鳟; 可用于鳟鱼(yellowtail)的药物不到10种。事实上, 实际使用和正在研制的药物种类远多于已获注册的药物^[1]。

1.2 使用对象及使用方法

抗菌药物几乎可用于所有水产养殖动物, 包括虾^[3]、蟹^[4]、鳖^[5]、贝^[6]、蛙^[7]、大鲵^[8]等。在淡水、半咸水及海水中都有使用, 但使用方法有所不同^[9]。使用的目的包括疾病的预防和治疗, 以及作为饲料添加剂以促进生长。药物的使用方式多为内服, 有的抗菌药也用于浸洗或泼洒, 对珍贵鱼类则较多使用腹腔注射或肌肉注射的给药方式^[1]。

1.3 适应症

抗菌药物的适应症主要是细菌感染, 但某种抗菌药物对不同病原菌的有效性是有差异的。在鱼类, 革兰氏阴性菌(G⁻菌)通常引起以出血和坏死为特征的败血症, 而革兰氏阳性菌(G⁺菌)则引起以颗粒型内部坏死为特征的慢性感染。通常, 用抗菌药物治疗急性感染可获得成功, 但对于慢性感染则比较困难。对于垂直传播(即通过卵巢)的感染(如由鲑肾细菌引起的鲑鳟鱼细菌性肾病)及细胞内感染, 很难在受感染细胞或组织内达到有效药物水平, 故治愈率较低。水产养殖动物有近百种致病细菌, 危害较严重的有近20种, 其中, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、灭气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、鲑肾细菌(*Renibacterium salmoninarum*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、鳃爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)、弧菌(*Vibrio* spp.)、鱼害巴斯德菌(*Pasteurella piscicida*)以及非溶血性链球菌(non-hemolytic *Streptococcus* sp.)、鲁氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)等是

收稿日期: 2001-02-15.

基金项目: 中国科学院生物学与生物技术特别支持项目(2001-2003).

作者简介: 李爱华(1963-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类细菌学和免疫学研究。

耐药性研究的重点。在欧洲主要以灭鲑气单胞菌^[10]、*V. anguillarum*^[11]为主,日本以 *V. anguillarum*^[12]、*E. tarda*^[13]、*P. piscicida*^[14]等为重点,而在我国及东南亚地区重点研究的是嗜水气单胞菌^[15,16]。

2 鱼类病原菌的耐药性

从20世纪60年代开始,抗菌药物在渔业上使用的范围日益扩大,最直接的副作用是对养殖动物的毒害,并且情况严重。20世纪80年代研究发现,抗菌药物对鱼体的免疫功能有不同程度的影响^[17],而病原菌的耐药性是最突出的问题,它不仅可以通过减弱药物对疾病的控制能力,而且存在向人类致病菌传播抗药性的潜在危险,同时药物残留问题也不可轻视^[18]。大量研究表明,土霉素和噻啉酸等药物可在养殖水体底泥中保持很长时间,并不断向水体释放,引发一系列不良的生态学效应^[19]。

2.1 耐药性的来源

早在1957年,在美国首次观察到由耐磺胺药的灭鲑气单胞菌引起的虹鳟流行性感染^[20]。1971年在日本养殖的大麻哈鱼中发生由耐磺胺药和耐氯霉素的灭鲑气单胞菌引起的大规模流行性感染^[21]。此后,由耐药菌引起的鱼病越来越频繁。

耐药基因的起源还不十分明确,通常认为耐药菌株是由抗菌药所施加压力选择出来的,抗菌药抑制或杀灭了敏感菌,耐药菌便得以存活下来成为优势种群。研究证实^[13],耐药菌株比例随药物使用的增加而平行增加;从野生鱼体内分离到的细菌,其抗药性明显低于从养殖鱼体内分离到的细菌;多数情况下,细菌对某种药物产生抗性只发生在该药物引入使用之后,而在此之前则极少见到(氨基糖甙类药物例外)。

养殖水体或鱼体内的耐药菌株可能在家畜养殖场或城市污水中已得到选择而成为鱼类病原菌耐药性的重要来源^[22]。业已证明,鱼类病原菌可与大肠杆菌互相传递耐药质粒。反之,Clark等^[23]从病人和环境(包括淡水鱼和海水鱼)分离到相似的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* O1 El Tor.),这提示鱼类细菌也有可能将耐药性传播给人类细菌。所以,水产药物是否会引起人类致病菌产生耐药性成为新药审批时的焦点问题之一。

细菌的耐药性表型都有其遗传物质作为基础,即存在耐药基因。对于耐药基因的来源目前所知甚少。从理论上说环境中存在1个基因库(Gene pool),微生物可以从中获得所需的遗传决定子,以增强其在不利环境中的生存能力。这个基因库由基因组DNA、质粒、噬菌体、插入序列(IS)以及可转座的成分组成,它们之间处于动态平衡,细菌可以从中获得耐药决定子。许多耐药基因可能起源于土壤中产生抗生素的菌株,用以保护宿主不受抗生素的作用^[24]。在有些耐药菌株中虽然没有找到耐药质粒,但细菌间的接合试验表明,存在某种携带有多重抗性的可自身转移的遗传成分,这

有待进一步研究。

2.2 鱼类病原菌的耐药机制

编码某种药物抗性的耐药基因既可能定位于质粒上,也可能存在于染色体上,或同时存在。细菌通过不同的机制抵抗各种药物的作用。耐药质粒介导的耐药性主要是通过产生药物灭活酶。如水解青霉素类药物的 β -内酰胺酶;钝化氨基糖甙类抗生素和氯霉素的乙酰转移酶;钝化氨基糖甙类抗生素和壮观霉素的腺苷酰基转移酶等^[25]。此外还存在其他一些机制,如对于红霉素和林可霉素,是由于rRNA的甲基化;对于四环素则是由于细胞膜的修饰而使得细胞通透性下降,药物难以进入。磺胺和三甲氧苄氨嘧啶(TMP)的耐药机制是产生了耐药性的酶类。对于利福平(Rifampicin),质粒介导的耐药性是由于药物外排增加^[26]。

对染色体介导的耐药性一直研究不足,其实这种机制在鱼类细菌中可能具有重要地位,因为许多耐药菌株中并未检测到耐药质粒,也未发现有质粒介导对呋喃唑酮、硫酸多粘菌素及喹诺酮(quinolone)等药物的抗性,而实际上细菌对呋喃唑酮的耐药性非常严重。喹诺酮类药物更是一个典型例子,到目前为止,已从至少5种常见病原菌中检测到抗性菌株。其中对*A. salmonicida*的研究较多,已证实是细菌细胞内药物积累减少的缘故,而这又是细菌外膜蛋白(OMP)的改变引起的^[27]。这些改变不仅引起细菌对这类药物的抗性,而且可能引起对AM、AP、CM、TC、OTC等的抗性^[28]。可见,如果使用土霉素等药物就有可能把喹诺酮类的耐药菌株选择出来。对喹诺酮的耐药性还存在另一种重要机制,即DNA促旋酶(或回旋酶)(DNA gyrase)的改变^[29]。此外,Ruiz等^[30]发现,鱼源多重耐药的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)可以获得或建立起多种不同的耐药机制,对包括喹诺酮类药物、氯霉素及氨基糖甙类在内的多种药物产生抗性。

2.3 耐药菌的判定标准

测定病原微生物对抗菌药物的敏感主要有2种方法:纸片扩散法和稀释法。扩散法具有快速简便的特点,常有国内外学者采用,但基本依照医学上耐药菌的判定标准^[5,15]。由于药物在鱼和人体内,甚至在不同鱼的体内其动力学特征均存在差别^[17],而判断细菌对某种药物是否敏感又必须考虑药物的动力学特征,所以完全套用医学上耐药菌、敏感菌的区分标准显然不合理。为此,大多数学者采用稀释法^[11-14],即测定抗菌药物对病原菌的最低抑菌浓度MIC(Minimum Inhibitory Concentration),再根据MIC的高低设置耐药菌的判定标准。但判定标准的设置仍不尽相同。一种做法是将所有试验菌的MIC进行作图^[12,31],然后把其中MIC明显偏高的部分看作耐药菌;有的学者是将不同年份测得的MIC值进行比较,MIC明显升高者定为耐药菌;也有学者综合多方面的文献资料,设置判定耐药性的MIC界限^[10,14,16,30]。

3 鱼类病原菌的耐药状况

日本、欧洲及东南亚学者曾较大规模地调查研究了当地鱼类细菌的耐药状况及其变迁, 涉及到的细菌主要有: *A. hydrophila*、*A. salmonicida*、*P. piscicida*、*E. tarda*、*E. ictaluri*、*V. anguillarum*、*Pseudomonas* sp.^[10~16], 结果发现:

每种细菌中耐药菌株的比例普遍达到非常高的水平, 而且均存在抗几种常用药物(包括 SA、TC、CM、KM、NA、OA 等)的高比例耐药菌株^[4, 32, 35, 37], 观赏鱼类的病原菌耐药现象更为严重^[38]。此外, 还检测到了耐药性非溶血性链球菌^[39]。表 1 显示了鱼类病原菌多重耐药的严重性。

表 1 鱼类病原的抗生素敏感谱
Table 1 Antibiotic sensitive patterns of fish pathogens

病原菌 Bacteria	抗菌谱 Antibiograms						参考文献 Reference
	敏感菌	1	2~3	4~5	6~7	8~	
<i>P. piscicida</i> (1981~1983) n = 281	19	78	25	118	41	0	[35]
<i>E. tarda</i> (1972~1984) n = 168	32	43	40	49	4	0	[37]
<i>E. tarda</i> (1983~1984) n = 186	34	12	87	53	0	0	[13]
<i>Ahydrophila</i> n = 34	0	0	8	16	9	1	[15]
<i>Ahydrophila</i> n = 26	2	5	16	2	1	0	[16]
<i>V. anguillarum</i> (1981~1983) n = 139	2	16	58	25	27	10	[38]
<i>V. anguillarum</i> (1981~1983) n = 114	1	7	78	7	2	19	[34]
<i>A. salmonicida</i> (1979~1981) n = 129	5	50	56	11	7	0	[39]

4 研究展望

水产养殖正处于迅速发展和成长的时期, 鱼类的集约化养殖导致了传染性疾病的频繁发生。然而现阶段只有很少的疫苗可用, 近期内不可能出现许多有效且可用于鱼群服用的新疫苗。因此, 在今后一段时期内鱼类养殖中还将继续使用化学治疗剂。然而, 化学药物的使用面临着许多困难: 疾病的种类越来越多, 导致药物的广泛使用、过量使用甚至滥用; 安全有效并获得批准的药物非常有限; 迫切需要药理学(包括药物代谢动力学)的数据; 病原菌的抗药性特别是多重耐药性日益严重; 人们日益关注药物在环境和鱼类制品中的残留, 等等。要解决这些问题, 必须加强以下相关研究: (1) 加强养殖鱼类的饲养管理, 研究疾病的流行病学, 通过采取各种预防措施减少疾病的发生, 这是减少药物使用的最根本的措施; (2) 提高疾病的诊断技术和进行治疗前的药敏试验, 以做到对症下药和提高药物的使用效率, 避免药物滥用; (3) 加强药理学研究, 提高或改进药物投喂技术, 减少药物使用量及对环境的影响; (4) 鉴定病原菌新的耐药机制, 监测病原菌耐药性的变化规律, 减少耐药菌的出现和传播。近年来医学上开展的耐药质粒消除研究就是基于此目的。总之, 我们对滥用抗菌药物以及细菌耐药性研究, 是为了更合理地使用药物, 避免滥用, 尽可能将使用药物所带来的副作用降到最低限度。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D, Chichester A. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish [M]. England: Ellis Horwood Ltd., 1993.
- [2] Michel C, Alderman D. Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality [M]. Paris: Office International Des Epizooties, 1992, 71-138, 254-259.
- [3] Bayer R C, Daniel P C. Safety and efficacy of oxytetracycline for control of gaffkemia in the American lobster (*Homarus americanus*) [J]. Fish Research, 1987, 5(1): 71-81.
- [4] 陈军昌, 徐欣, 吕晓民. 腐败假单胞菌人工感染河蟹的毒性试验及药物敏感性试验[J]. 水产科学, 1999, 18(2): 18-20.
- [5] 蔡完其, 孙佩芳, 朱泽闻, 等. 中华鳖脑膜炎败血性黄杆菌病的研究[J]. 水产科技情报, 1997, 24(4): 156-161.
- [6] 刘金屏, 聂丽屏, 丁明进, 等. 皱纹盘鲍 (*Halitis discus*) 脓疱病的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 78-84.
- [7] 叶雪平, 杨广智, 罗毅志, 等. 牛蛙链球菌病防治技术研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29(2): 15-21.
- [8] 贺路, 刘鉴毅. 大鲵的病害及其防治[J]. 水利渔业, 1999, 19(1): 29-30.
- [9] 李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深. 半咸水、海水对几种鱼用抗菌药物体外抗菌活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 544-548.
- [10] Tsoumas A, Alderman D J, Rodgers C J. *Aeromonas salmonicida*: development of resistance to 4-quinoline antimicrobials[J]. J Fish Dis, 1989, 12(5): 493-507.

- [11] Pedersen K, Tiainen T, Larsen J L. Antibiotic resistance of *Vibrio anguillarum*, in relation to serovar and plasmid contents [J]. Acta Vet Scand, 1995, 36(1):55-64.
- [12] Aoki T, Kitao T. Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu in Japan [J]. J Fish Dis, 1981, 4(2):223-230.
- [13] Aoki T, Sakaguchi T, Kitao T. Multiple drug resistant plasmids from *E. tarda* in eel culture ponds [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1987, 53(10):1 821-1 825.
- [14] Takashima N, Aoki T, Kitao T. Epidemiology surveillance of drug-resistant strains of *Pasteurella piscicida* [J]. Fish Pathol, 1985, 2(2/3):209-217.
- [15] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish [J]. J Fish Dis, 1992, 15(2):191-196.
- [16] 李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深. 我国鱼类病原—嗜水气单胞菌的耐药性研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1):56-63.
- [17] Grondel J L, Nouws J F M, Muiswinkel W B. The influence of antibiotics on the immune system: Immunopharmacokinetic investigations on the primary anti-SRBC response in carp after oxytetracycline injection [J]. J Fish Dis, 1987, 10(1):35-43.
- [18] Bjorklund H V, Raberghemi, Bylundg, et al. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms [J]. Aquaculture, 1991, 97(1):85-96.
- [19] Husevag B, Lunestad B T, Johannessen P J, et al. Simultaneous occurrence of *Vibrio salmonicida* and antibiotic-resistant bacteria in sediments at abandoned aquaculture sites [J]. J Fish Dis, 1991, 14(6):631-640.
- [20] Snieszko S F, Bullock G L. Control of furunculosis in rainbow trout [J]. U S Fish and Wildfish Service, 1957, 125(10):555-564.
- [21] Aoki T, Egusa, Yada C, et al. Studies of the drug resistance of fish-pathogenic bacteria[J]. Jap J Microbiol, 1972, 16(3):233-238.
- [22] Starliper C E, Cooper R K, Shotts E B, et al. Plasmid-mediated Romet resistance of *Eduardsiella ictaluri* [J]. J Aquat Anim, 1993, 5(1):1-8.
- [23] Clark C G, Kravetz A N, Alekseenko V V, et al. Microbiological and epidemiological investigation of cholera epidemic in Ukraine during 1994 and 1995 [J]. Epidemiol Infect, 1998, 121(1):1-13.
- [24] Tenover F C. Studies of antimicrobial resistance genes using DNA probes [J]. Antimicrob Agents and Chemother, 1986, 29(5):721-725.
- [25] Aoki T. Drug-resistance plasmids from fish pathogens [J]. Microbiol Sci, 1988, 5(7):219-223.
- [26] Chandrasekaran S, Lalithakumari D. Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens* [J]. J Med Microbiol, 1998, 47(3):197-200.
- [27] Barnes A C, Lewin C S, Hastings T S, et al. Alterations in outer membrane proteins identified in a clinical isolate of *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida [J]. J Fish Dis, 1992, 15(3):279-282.
- [28] Barnes A C, Lewin C S, Hastings T S, et al. Cross resistance between oxytetracycline and oxolinic acid in *Aeromonas salmonicida* associated with alterations in outer membrane proteins [J]. FEMS Microbiol Lett, 1990, 60(3):337-339.
- [29] Oppegaard H, Sorum H. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(5):1 126-1 133.
- [30] Ruiz J, Capitano L, Nunez L, et al. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish [J]. J Antimicrob Chemother 1999, 43(5):699-702.
- [31] Kim E-h, Aoki T. Drug resistance and broad geographical distribution of identical distribution of identical R plasmids of *P. piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan [J]. Microbiol Immunol, 1993, 37(2):103-109.
- [32] Aoki T, Kanazawa T, Kiao T. Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains [J]. Fish Pathol, 1985, 20(2/3):199-208.
- [33] Zhao J, Kim E-h, Kobayashi T, et al. Drug resistance of *Vibrio anguillarum* isolated from Ayu between 1989 and 1991 [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(8):1 523-1 527.
- [34] Aoki T, Kitao T. Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium, *Pasteurella piscicida* [J]. J Fish Dis, 1985, 8(4):345-350.
- [35] Aoki T, Kitao T. Drug resistance and transferable R plasmids in *E. tarda* from fish culture ponds [J]. Fish Pathol, 1981, 15:277-281.
- [36] Aoki T, Kanazawa T, Kitao T. Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains [J]. Fish Pathol, 1985, 20:199-208.
- [37] Aoki T, Kitao T, Iemura N, et al. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains in cultured and wild salmonids to various chemotherapeutics [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1983, 49(1):17-22.
- [38] Dixon B A, Yamashita J, Evelyn F. Antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. isolated from tropical fish imported from Singapore [J]. J Aquat Health, 1990, 2(3):295-297.
- [39] Aoki T, Takami K, Kitao T. Drug resistance in a non-haemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* [J]. Dis Aquat Orgs, 1990, 8(2):171-177.

Antibacterial drugs used in aquaculture and drug resistance of fish bacterial pathogens

LI Ai-hua

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The use of antibacterial agents is a key measure in the prevention and treatment of diseases in aquaculture animals. But antibacterial agents have potential hazards and can produce various kinds of side effects in aquatic environment if they are used irrationally, such as drug resistance, unacceptable drug residues in marketable fish and environment. In order to provide some scientific basis for the rational use of antibacterial agents, the following topics are discussed: the history and present status of antibiotic medicines used in aquaculture, the side effects and indication of the medicines, the situation of resistance and the resource of the resistance, the mechanism of resistance, the criterion for determination of resistant bacterial strains, as well as the prospect for further study in this field.

Keywords: fish pathogenic bacteria; antibacterial drug; antibiotic resistance

作者更正

本刊 2001 年第 8 卷第 4 期所刊论文《摄食促进物质对真鲷摄食和生长的影响》(见第 58~61 页)中,表 3 应修正如下:

表 3 各组饲料摄食率
Table 3 Intake rate of experimental diets

组别 Group	摄食促进物质 Feeding stimulant	摄食量/g Intake volume	摄食率/% Intake rate	相对摄食率 Relative intake rate
1	对照组 Control	73.0 ± 1.0 ^a	57.9 ± 1.2 ^a	100
2	A ₁	90.5 ± 5.0 ^d	71.8 ± 4.0 ^d	124
3	A ₁ + 甜菜碱 A ₁ + Betaine	77.2 ± 2.2 ^b	61.3 ± 1.7 ^b	106
4	A ₂	84.4 ± 4.4 ^c	67.0 ± 3.5 ^c	116
5	A ₂ + 甜菜碱 A ₂ + Betaine	76.9 ± 1.9 ^b	61.0 ± 1.5 ^b	105

注: A₁—甘氨酸 + 丙氨酸 + 组氨酸 + 精氨酸 Gly + Ala + His + Arg; A₂—甘氨酸 + 丙氨酸 + 缬氨酸 Gly + Ala + Val. 表中同列数据上标不同字母表示差异显著(P < 0.05)。Values with different superscripts in the same columns show significant difference.

作者在此深表歉意并感谢中国农业科学院饲料研究所曾虹先生的悉心指正。

梁萌青
2002 年 2 月