

養鰻池之 R⁺ 抗藥細菌

郭光雄 · 鍾虎雲*

Drug Resistant R⁺ Bacteria in Eel-Cultured Pond

G. H. Kou and H. Y. Chung*

Abstract

A total of 748 strains of drug-resistant gram-negative bacteria were isolated from the viscera of cultured eels and pond-water. One hundred and two strains were demonstrated to possess R factor (R⁺). Among the R⁺ strains there were 23.4% Sulfamonomethoxine (Su) resistant strains, 9.6% Tetracycline (Tc) resistant strains, 15.4% Chloramphenicol (Cm) resistant strains and 2.9% P-7138 (Nf) resistant strains. The incidences of R⁺ strains in *Salmonella*, *A. hydrophila* and *E. anguillimortifera* were 88.9%, 20.6% and 22.2%, respectively. No R⁺ strains were detected in *Proteus*, *Hafnia*, *Alcaliagenes* and several unidentified bacteria. Most R⁺ strains (68 of 102) possess 2 (Su, Tc) or 3 (Su, Sm, Tc) resistant markers.

緒 言

近年來，本省養鰻業突飛猛進，年產量已超過二萬公噸，但由於本省位處亞熱帶，水溫終年偏高，加上高養殖密度，魚池老化，給餌之不適當及其他各種不良之環境因子，常常造成各種疾病之發生，尤以細菌性疾病為甚。在疾病之防治上，業者每每皆使用抗生素等化學療劑，由於業者不諳藥理，又缺乏對疾病診斷之智識，常常濫施藥物⁽¹⁴⁾。除此之外，飼料中亦常有添加藥劑以促進生長預防疾病者。如此，大量並長期使用抗生素等化學療劑之結果，遂導致抗藥性細菌的大量產生^(7,14)。抗藥細菌若具有 R 因子，則由於細菌之接合作用，能將抗藥性傳遞給受容菌 (Recipient)，造成多種抗藥細菌之產生及廣泛流傳。

本省養鰻池抗藥細菌出現頻度極高⁽¹⁴⁾，可能是受到 R 因子及廣泛使用抗菌劑之影響。不管從公共衛生之立足點，或是養殖鰻魚疾病防治之觀點來看，具 R 因子之抗藥細菌之出現情況及其抗藥樣態，實有究明之必要，以利檢討各種抗菌劑之使用。本研究就本省養鰻業者常用之藥物：磺胺劑 Sulfamonomethoxine (Su)，四環黴素 Tetracycline (TC) 氯黴素 Chloramphenicol (Cm) 及 P-7138 (Nf) 四種抗菌劑，針對上述之問題加以檢討，將所得之結果在此提出，以供參考。

* 國立台灣大學理學院動物學研究所
(Department of Zoology, College of Science, N. T. U.)

材料與方法

1. 抗藥細菌之分離

自1977年5月至1978年3月間，分別自鹿港地區，及高雄與屏東地區之養鰻場、由鰻體內臟及池水中分離抗藥細菌、分離之方法及抗菌劑之種類與濃度均與前報⁽¹⁴⁾相同，分離菌之鑑定及分類係按 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed (1974)⁽³⁾ 為基準。

2. 傳達性R因子之檢出

分離菌 R factor 之檢出，係以 *Escherichia coli* RC-85nal (methionine requiring, nalidixic acid-resistant F-derivative of *E. coli* K-12，對於 Su, Tc, Cm 及 Nf 均具敏感性) 為受容菌。將分離菌與受容菌分別培養於 Penassay broth (Difco) 中、於 37°C 下培養至吸光度 (OD) 為 0.4 (約 4×10^3 cells/ml)，然後各取等量培養液混合後，再於 37°C 下培養 24 小時，再轉種於含 Nalidixic acid 100 μ g/ml 及各該分離菌之抗菌劑 (濃度與上述相同) 之 MacConkey 平板培養基 (Difco) 上，於 37°C 下培養 24 小時，若分離菌為 Lactose negative，且菌落之顏色為磚紅，則可判定分離菌為 R⁺ 菌。若分離菌受容菌同為 Lactose fermentative 時，則須將菌落鉤出接種於 EMB 平板培養基 (Difco) 上；於 37°C 下培養 24 小時長出之菌落若表面具有金屬光澤，亦可判定此分離菌為 R⁺ 菌。其他在 MacConkey 平板培養基上菌落不呈磚紅色者或是在 EMB 平板培養基上菌落不呈金屬光澤者皆為 R⁻ 菌。

3. R factor 之抗藥性標記

受容菌接受 R factor 後，於 37°C 下以振盪法培養於 Penassay broth 中至吸光度 (O.D) 為 0.3 時，取 0.1 ml 之培養液接種於普通平板培養基上，以 Conradi's stick 均勻塗抹後，將 Streptomycin (Sm), Cm, Tc, Nf, Aminobenzyl-penicillin (ABP), Kanamycin (Km) 及 Su 之藥餅 (昭和) 放置其上，於 37°C 下培養 18-24 小時。取 R⁻ 菌株依同法進行實驗，比較二者之抑制範圍，以決定抗藥標記 (Resistance marker) 之樣態 (Pattern)。此一項目在日本宮崎大學進行。

結 果

1. 抗藥細菌之分離

由含抗菌劑之平板培養基所分離之抗 Su 等四種藥劑之細菌計有 748 株，其中抗 Su 者 214 株，抗 Tc 者 219 株，抗 Cm 者 175 株，抗 Nf 者 140 株。按種類可分為 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella anguillimortifera*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, Unidentified Enterobacteriaceae, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* 及 Unidentified gram negative strains 等 13 類別 (Table 1)。其中大腸菌 *E. coli* 約佔四分之一 (190 株)，水中常有細菌之 *A. hydrophila* 亦達 126 株，數目僅次於 *E. coli*。除 *A. hydrophila* 及 *Pseudomonas* 外，絕大部份的抗藥細菌都是腸內細菌科的細菌。

Table 1. Incidence of R⁺ resistant strains in medium supplemented with Sulfamonomethoxine (Su), Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm) or P-7138 (Nf).

Species or genus	R ⁺ resistant strains selected by				Total (%)
	Su (%)	Tc (%)	Cm (%)	Nf (%)	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	16/58 (27.6)	4/41 (9.8)	5/16 (31.3)	1/12 (9.1)	26/126 (20.6)
<i>Edwardsiella anguillimortifera</i>	0/4 (0)	1/6 (16.7)	3/14 (21.4)	2/3 (66.7)	6/27 (22.2)
<i>Citrobacter freundii</i>	8/21 (38.1)	2/26 (7.7)	3/24 (12.5)	0/22 (0)	13/93 (14.0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1/5 (20.0)	1/19 (5.3)	2/12 (16.7)	0/14 (0)	4/50 (8.0)
<i>Escherichia coli</i>	10/65 (15.4)	1/47 (2.1)	6/32 (18.8)	1/46 (2.2)	18/190 (9.5)
<i>Hafnia</i>	0/7 (0)	0/9 (0)	0/7 (0)	0/6 (0)	0/29 (0)
<i>Klebsiella</i>	0/10 (0)	1/7 (14.3)	0/9 (0)	0/6 (0)	1/32 (3.1)
<i>Proteus</i>	—	0/8 (0)	0/3 (0)	—	0/11 (0)
<i>Salmonella</i>	5/6 (83.3)	7/8 (87.5)	4/4 (100)	—	16/18 (88.9)
Unidentified Enterobacteriaceae	4/13 (30.8)	0/15 (0)	3/10 (30.0)	0/4 (0)	7/42 (16.7)
<i>Alcaligenes</i>	0/9 (0)	0/8 (0)	0/11 (0)	0/3 (0)	0/31 (0)
<i>Pseudomonas</i>	6/9 (66.7)	4/21 (19.0)	1/30 (33.3)	0/24 (0)	11/84 (13.1)
Unidentified strains	0/7 (0)	0/4 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/15 (0)
Total	50/214(23.4)	21/219(9.6)	27/175(15.4)	4/140(2.9)	102/748(13.6)

2. R factor 菌株之檢出

在748株抗藥菌中具有R因子者有102株(13.6%)，其中抗Su菌株之214株中有50株具有R factor，所佔百分率最高，達23.4%。140株抗Nf菌株中僅4株具有R factor，僅佔2.9%，其餘抗Tc及Cm者均在10%左右。就細菌種類而言，*Hafnia*、*Proteus*、*Alcaligenes*及Unidentified strains等四類分離菌均未發現R⁺菌株。R⁺抗藥菌株出現率最高者為*Salmonella*菌，達88.9%，*Klebsiella* R⁺菌之出現率則僅有3.1%。魚類條件性病原菌*A. hydrophila*及*E. anguillimortifera*之R⁺抗藥菌之出現率均達20%左右，而且在3株抗Nf之*E. anguillimortifera*中有2株具有R⁺ factor，其餘分離菌R⁺之出現率則在10%上下。

由池水分離出之269株抗藥細菌中有27株具有R因子，佔10%，由鰻魚內臟分離出來之479株抗藥細菌中，75株具有R因子，佔15.7%，較池水略高。由腸以外的內臟分離出來之抗藥細菌中，具有R因子者之出現率，以脾臟之7.7%最低，腎與肝幾無差異，前者為15%，後者為14.6%。依分離菌之類別而言內臟中具有R因子之抗藥細菌主要為*A. hydrophila*、*E. anguillimortifera*、*Salmonella*及*Citrobacter*與Unidentified Enterobacteriaceae五類。但*Salmonella*及*Citrobacter*二屬之R⁺菌僅出現於腸中。*Salmonella*之R⁺菌出現率高達88.9%，水中及腸中出現的比例略同。魚類條件性病原菌之*A. hydrophila*由內臟分離之72株抗藥菌中亦有26.4%為R⁺菌，其中由腎臟分離之12株中有9株具R因子，比例達75.0%，由脾臟分離之20株菌中僅1株(5%)具有R因子。但是由池水中分離之*A. hydrophila*抗藥菌54株中，僅7株具有R因

Table 2. Incidence of R⁺ resistant strains isolated from the viscera of cultured eels and pond-water

Species or genus	Cultured eels					Subtotal	Pond-water	Total
	Intestinal tract	Kidney	Liver	Spleen				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7/16 (43.8)	9/12 (75.0)	2/24 (8.3)	1/20 (5.0)	19/72 (26.4)	7/54 (13.0)	26/126 (20.6)	
<i>Edwardsiella anguillimortifera</i>	3/10 (30.0)	1/8 (12.5)	2/6 (33.3)	0/3 (0)	6/27 (22.2)	—	6/27 (22.2)	
<i>Citrobacter freundii</i>	6/24 (25.0)	0/6 (0)	0/9 (0)	—	6/39 (15.4)	7/54 (13.0)	13/93 (14.0)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	0/8 (0)	—	—	—	0/8 (0)	4/42 (9.5)	4/50 (8.0)	
<i>Escherichia coli</i>	11/116 (9.5)	0/18 (0)	4/21 (19.1)	2/14 (14.3)	17/169 (10.1)	1/21 (4.8)	18/190 (9.5)	
<i>Hafnia</i>	0/8 (0)	0/3 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/29 (0)	
<i>Klebsiella</i>	1/9 (11.1)	0/5 (0)	0/4 (0)	0/2 (0)	1/20 (5.0)	0/12 (0)	1/32 (3.1)	
<i>Proteus</i>	0/6 (0)	—	—	—	0/6 (0)	0/5 (0)	0/11 (0)	
<i>Salmonella</i>	14/16 (87.5)	—	—	—	14/16 (87.5)	2/2 (100)	16/18 (88.9)	
Unidentified Enterobacteriaceae	1/11 (9.1)	1/9 (11.1)	5/12 (41.7)	0/7 (0)	7/39 (17.9)	0/3 (0)	7/42 (16.7)	
<i>Alcaligenes</i>	0/2 (0)	0/8 (0)	0/4 (0)	0/1 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/31 (0)	
<i>Pseudomonas</i>	3/27 (11.1)	1/9 (11.1)	0/7 (0)	1/3 (33.3)	5/46 (10.9)	6/38 (15.8)	11/84 (13.1)	
Unidentified strains	0/5 (0)	0/2 (0)	—	—	0/7 (0)	0/8 (0)	0/15 (0)	
Total	46/258 (17.8)	12/80 (15.0)	13/89 (14.6)	4/52 (7.7)	75/479 (15.7)	27/269 (10.0)	102/748 (13.1)	

子 (13.0%)，出現率為內臟之半。另一病原菌 *E. anguillimortifera* 則與 *A. hydrophila* 之情形略有不同，R⁺菌出現率以肝臟之 33.3% 為最高，腸之 30.0% 次之，而脾臟則完全無 R⁺ 菌出現。又，令人注意的是由池水無法分離出 *E. anguillimortifera* 之抗藥菌 (Table 2)。

3. R factor 之抗藥性標記樣態 (marker pattern)

102 株 R⁺ 抗藥菌之抗藥性樣態共有 8 種，即 Su.Tc., Su.Cm., Sm.Cm., Su.Sm.Cm., Su.Sm.Tc., Su.Tc.Nf., Su.Cm.Tc., 以及 Su.Sm.Cm.Tc., (Table 3)。就細菌種類言，以

Table 3 Drug Resistance pattern of R plasmids isolated from the viscera of cultured eels and pond-water.

Category of bacteria	Resistance pattern of R plasmid	No. of strains from		Total
		Eelviscera	pond-water	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Su, Tc	3	3	6
	Su, Sm, Tc	12	4	16
	Su, Sm, Cm	3	0	3
	Su, Tc, Nf	1	0	1
<i>Edwardsiella anguillimortifera</i>	Su, Cm	1	0	1
	Su, Cm, Tc	2	0	2
	Su, Tc, Nf	2	0	2
	Su, Sm, Cm, Tc	1	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	Su, Tc	4	2	6
	Su, Cm, Tc	0	5	5
	Su, Sm, Cm, Tc	2	0	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	Su, Tc	0	1	1
	Su, Sm, Cm	0	1	1
	Su, Sm, Tc	0	2	2
<i>Escherichia coli</i>	Su, Tc	2	0	2
	Su, Cm	2	0	2
	Su, Sm, Tc	6	1	7
	Su, Sm, Cm	3	0	3
	Su, Tc, Nf	1	0	1
	Su, Sm, Cm, Tc	3	0	3
<i>Klebsiella</i>	Su, Tc	1	0	1
<i>Salmonella</i>	Su, Sm, Tc	1	L	1
	Su, Sm, Cm, Tc	15		15
Unidentified Enterbacteriaceae	Su, Tc	1	0	1
	Su, Sm, Tc	3	0	3
	Su, Sm, Cm, Tc	1	0	3
<i>Pseudomonas</i>	Su, Tc	1	1	2
	Su, Sm, Tc	3	3	6
	Su, Sm, Cm	1	2	3
Total		77	25	102

Su: Sulfamonomethoxine, Sm: Streptomycin, Cm: Chloramphenicol, Nf: P-7138.
Tc: Tetracycline, L: 2 strains lost.

Klebsiella 菌所具有之標記樣態最少，僅一種 (Su. Tc.)，而 *E. coli* 之標記樣態則多達五種，其餘細菌之大部份則在三至四種間。在供試之 102 株 R⁺ 菌株中具有 3 個抗藥標記者有 56 株，具有 2 個及 4 個抗藥標記者則幾乎相同，各為 22 株及 24 株。又具有 3 個標記之 56 株 R⁺ 菌中，以具有 Su. Sm. Tc. 樣態之菌株最多，計 40 株，佔 71%。就藥的種類而言，所有供試之 R⁺ 菌株，均有 Su 之標記，具 Tc 標記者有 89 株，具 Sm 標記者為 74 株，具 Cm 標記者為 39 株，具 Nf 標記者却僅有 4 株。而且 Nf 標記僅在 Su. Tc. Nf. 之樣態中出現。

討 論

自從 1959 年，日本學者因研究人類痢疾而發現 R 因子可傳遞抗藥性後⁽⁹⁾，不帶 R 因子之非病原性菌如 R⁻ 之 *E. coli* 雖然在疫病的發生上扮演了平衡的作用，而間接的減低了病原性抗藥菌單獨存在時所造成的損害⁽⁸⁾，但是因為抗菌劑使用不當等因素所誘發抗藥菌大量的增加，所造成的問題是愈來愈嚴重。在水產界中也已形成嚴重的問題，而受到廣泛的注意^(10,12,13,14)。1973 年 Smith 氏曾著文指出⁽⁷⁾，長期低劑量的使用抗生素的結果，會誘發抗藥菌的產生，此現象在腸內細菌及相關的革蘭氏陰性菌更為常見。Davis 等⁽⁴⁾指出抗四氫環素 (Tc) 的質體，在 R 因子的 Episomal DNA 上的位置，緊臨控制細菌性別的位置，所以抗 Tc 的菌株也最容易產生，Watanabe 等也認為抗 Tc 藥劑之細菌中，攜帶 R 因子的比例特別高⁽¹⁰⁾。本研究所得之結果，亦顯示抗 Tc 之菌株最多，高達 219 株，佔所有抗藥菌 784 株之 29.3%，與 Watanabe 等之指摘頗為一致。另抗 Su 之菌株亦達 214 株之多，為 28.6% 與抗 Tc 菌之 29.3% 出現率相近。在前報中亦指出抗 Su 菌株之出現率與抗 Tc 菌株之出現率，在統計學上二者無顯著之差異⁽¹⁴⁾。Aoki 等⁽³⁾研究日本養殖魚類之抗藥菌時，也發現抗磺胺劑 Sulphanilamide 與抗 Tc 之菌株，在出現率上二者皆高於他菌，且在統計學上無顯著差異，與本研究所得之結果一致。

在本研究中，抗藥菌中 R⁺ 菌出現之比例，以沙氏桿菌為最高，達 88.9%，不過沙氏桿菌之出現率相當低，所有分離菌之 748 株中僅 18 株為沙氏桿菌，出現率為 2.4%，顯示其在抗藥性之散佈上所佔之位置並不顯著。大腸菌 *E. coli* 之分離菌株為 190，出現率為 25.4% 較他菌為高，不過其中具有 R 因子之菌株却很少，僅 18 株，出現率為 9.5%，故與沙氏桿菌相同，在抗菌性之傳播上所佔之位置並不顯著，關於此點在前報中已做詳細之討論，請參照。魚類病原菌 *A. hydrophila* 的抗藥菌及其 R⁺ 菌株之出現率皆不低，為 16.8% (126/748) 及 20.6% (26/126)，而且由魚體分離之抗藥菌株中 R⁺ 菌株之比例為 26.4% (19/72)，較水中所分離之 13% (7/54) 高出甚多，Shotts 等⁽⁵⁾由觀賞魚及其飼育水，進行 *A. hydrophila* 抗藥菌之 R⁺ 菌分析，亦提出相同之結果。如此顯示以化學療法防治鰻魚赤鰓病的發生，必然漸趨困難。另一魚類病原菌，*E. anguillimortifera* 的出現率相當低，為 3.6% (27/748)，但是其 R⁺ 菌的出現率却相當高，為 22.2% (6/27)。Aoki 等⁽¹⁾曾指出由魚類、蛇類水生動物及人類等所分離出的 *E. anguillimortifera* 菌中 R⁺ 菌僅出現於由魚類所分離之菌株中，而且比例高達抗藥菌之半數以上。但是由蛇類及人類所分離之菌株中從未發現 R⁺ 菌，故鰻魚池中 *E. anguillimortifera* 之 R⁺ 菌株比例偏高與濫施藥物的關連性最大，今後有關此點除有待進一步的瞭解外，對於鰻病之藥物施用應多加注意。

又，Shotts 等⁽¹⁵⁾指出各種抗藥菌中，多數帶有二個以上的抗藥標記，本研究結果，亦顯示各種抗藥菌中所帶之抗藥 marker 皆在 2 個以上，以具 3~4 種標記者為最多。不過本研究中所分離出來之 R⁺ 抗藥菌株中，都帶有抗 Su 之標記，頗堪玩味，實有待進一步究明之必要。

摘 要

由鰻池池水及鰻魚內臟共分離出 748 株抗藥菌，計十三類別；*A. hydrophila*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, Unidentified Gram negative strain 及九屬腸內細菌，其中具有 R 因子者 102 株，抗各類藥劑菌株中 R⁺ 菌株之出現率，分別為抗 Sulfamonomethoxine 者為 23.4%，抗 Tetracycline 者為 9.6%，抗 Chloramphenicol 者為 15.4% 及抗 P-7138 者之 2.9%。十三類別之抗藥菌中，九類出現 R⁺ 菌，其中以 *Salmonella* 之 R⁺ 菌株出現率最高，達 88.9%，其次為 *A. hydrophila* 及 *E. anguillimortifera*，分別為 20.6% 及 22.2%。*Hafnia*, *Proteus*, *Alcaligenes* 及 Unidentified strains 中無 R⁺ 菌出現。除 *Enterobacter cloacea* 外，內臟分離菌之樣態較由水中分離者為多。又各種 R⁺ 抗藥菌中，以帶 2 至 3 個抗藥標記之菌株最多。具 2 個標記者以 Su, Tc 之樣態最多，具 3 個標記者則以 Su, Sm, Tc 之樣態最多。

參 考 文 獻

1. Aoki, T., T. Arai, and S. Egusa. (1977). Detection of R plasmids in naturally occurring fish-pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. Microbiol. Immunol. 21 (2): 77-83.
2. Aoki, T., S. Egusa, Y. Ogata, and T. Watanabe. (1971). Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquenfaciens*. J. Gen. Microbiol. 65: 343-349.
3. Buchaman, R.E., and N.E. Gibbons. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Md. 1246 pp.
4. Davies, J.E., and R. Rownd. (1972). Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae. Science. 176: 758-768.
5. Shotts, E.B., V.L. Vanderwork, and L.M. Campell. (1976). Occurrence of R factors associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from aquarium fish and waters. J. Fish. Res. Board Can. 33(4)736-740.
6. Smith, H.W. (1969). Veterinary implications of transfer activity. P. 213-226 in B. W. Wolstenholme and M. O. Conner (ed.) Ciba Found Symp. Bacterial Episomes and Plasmids J.A. Churchill Ltd. London.
7. ——— (1973). The effect of the use of drug resistant bacteria in animals. P.67-100 in Advances in Veterinary Science. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
8. Sonnenwirth, A.C. (1973). Bacteria indigenous to man. P. 954-959 in Davis, B. D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood and M. McCarty (ed.) Microbiology. Haprer and Row. Hogerstown, Maryland.
9. Watanabe, T., and T. Fukasawa. (1960). Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae 1. Transfer of Resistance Factors by conjugation.
10. Watanabe, T., T. Aoki, Y. Ogata, and S. Egusa. (1971). R factors related to fish culturing. Annuals of The New York Academy of Sciences Vol. 182. pp 383-410.
11. Watanabe. T., and T. Fukasewa. (1961). Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae 1. Transfer of resistance factors by coujugation.

J. Bacteriol 81: 669-678.

12. 青木宙、江草周三、渡邊力。(1972). 水産養殖における薬剤耐性R因子, 日本細菌學雜誌, 27(6)/ 762-767.。
13. 青木宙。(1974). コイの養殖池水および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究, 日水誌40 (3):247-254.。
14. 陳宏遠、郭光雄。(1978). 水産養殖抗藥細菌之研究— I . 養殖鰻魚抗藥菌之抗藥性, JCRF Fish Series No. 34. P. 1-13. Taipei. Taiwan.