

控制对虾弧菌病药物的实验研究

郑天凌 陈 瑛 李福东 蔡立哲

(厦门大学, 361005)

提 要 研究了一株对虾弧菌病病原菌对24种药物的敏感性,测定了几种抗菌性较强、抗菌谱较广且价格较低廉的药物对该菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)以及药物在海水环境中对该菌作用的有效性和药物联用效果。结果表明,不同药物具有不同的MIC值,在特定的实验条件下,药物之间的作用表现为:协同、拮抗和无关三种结果,不同药物在海水中作用时间不一。本文对药物滥施乱用的后果进行了讨论并提出了有效控制病菌、合理用药的建议,同时强调在水产养殖活动中,在防治微生物病害方面实施生态防治技术的重要性和必要性。

关键词 对虾弧菌病,有效控制药物,对虾属。

当前,随着对虾养殖生产中各种微生物病害的不断发生,抗生素得以广泛应用,然而由于病原学、药物学等方面知识的不足,在养殖过程中存在严重滥用乱施药物现象[方金瑞等,1991;朱效斌,1991;Aubert等,1992;Zheng,1991](Yasuda,1980)。药物的不合理使用,其结果不但浪费成本,使疾病无法得到有效控制,而且会造成养殖动物生理障碍及药物残留,污染养殖水环境,使养殖生态系中的正常菌群失调,并导致耐药性微生物大量出现,从而给日后疾病的控制带来更大的困难。针对上述问题,我们以当前对虾养殖生产中危害突出的弧菌病病原菌为材料进行合理用药探讨。

一、材 料 和 方 法

1. 药物来源 药敏纸片购自杭州微生物试剂厂,实验用抗菌药物为市售药物。

2. 试验菌株 试验菌株系本课题组于1988年分离于当地对虾养殖场濒死虾体并作鉴定。

3. 实验方法 ①药敏实验:以纸片法在肉汤固体培养基上进行。经30℃恒温培养24h,观察抑菌圈有无与大小。②最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)测定:采用试管双倍稀释法测定药物对试验菌株的MIC和MBC值。将抗生素原液0.2ml加入第一管中,使其浓度为128μg/ml,倍比稀释至所需管数,加入菌液,置30℃培养24h。肉眼观察结果,以能抑制细菌生长的最低浓度为MIC。继续培养48h,以无细菌生长的最低浓度为MBC。③药物联用实验:采用棋盘法进行[Moellering等,1971]。单种药物在联用前后的MIC之比称为小数抑菌浓度(FIC),而FIC指数(FIC-Index)则为两种药物的FIC之和。若A药与B药联用,即联用后的A药MIC值/联用前的A药MIC值+联用后的B药MIC值/联用前的B药MIC值=FIC_A+

收稿日期:1993-08-09。

(1)Yasuda K., 1980. Study on the role of marine bacteria associated in the cultured of *Prawn Japonicas*. Master's thesis. University of Miazaki, 120.

$FIC_B = FIC$ 指数。当 FIC 指数 ≤ 0.75 时,则两药为协同作用; FIC 指数 = 1 时,两药为相加作用; FIC 指数 < 2 时,为无关; FIC 指数 ≥ 2 时,则两药为拮抗作用。 FIC 指数越小,协同作用越强,若 $FIC < 0.5$ 则认为两药有显著的协同作用。④杀菌曲线:将试验菌株接种于肉汤培养液中,30℃ 培养 18h,稀释使其浓度为 2×10^5 cells/ml,移至含有两种药物的试管中,两种药物的浓度都为 $1/4MIC$ 。25℃ 分别培养 1、2、4、8、16、24h,而后作菌数测定。联用管与单独管比较,菌落数减少 100 倍以上者为协同作用。

二、结 果

1. 药物敏感试验 用纸片法测定 24 种抗菌药物对试验菌株的药敏实验结果见表 1。从表 1 可见,实验药物对 Z8809 菌株所表现的抑菌作用,抑菌圈直径大于 30mm 的有 4 种,占 16.7%;抑菌圈在 20~30mm 之间的有 14 种,占 58.3%;抑菌圈小于 20mm 的有 6 种,占 12.5%。其中氯霉素和磺胺药的抑菌效果突出。而有 3 种药物(12.5%)对试验菌株无抑菌作用。

表 1 不同药物对 Z8809 菌株的抗菌活性(抑菌圈直径:mm)

Table 1 Antibacterial activities of different drugs against the strain Z8809 (mm)

抗菌药物	抑菌圈	抗菌药物	抑菌圈
吡呱酸	32	呋喃唑酮	25
氟呱酸	30	多粘菌素	23
磺胺甲基异恶唑 + TMP	30	丁胺卡那霉素	15
氯霉素	35	卡那霉素 I	17
磺胺	35	卡那霉素 V	16
四环素	30	麦迪霉素	0
复方新诺明	30	红霉素	20
链霉素	24	土霉素	25
庆大霉素	24	先锋霉素	33
呋喃妥因	24	乙酰螺旋霉素	0
妥布霉素	20	卡那霉素	20
新霉素	20	万古霉素	0

2. MIC、MBC 测定 从药敏实验所得结果中选择几种抗菌谱较广、抗菌能力较强且价格较低廉的药物测定试验菌株的 MIC 和 MBC。从表 2 可看出,不同药物的 MIC 值相差较大。四环素对该病菌的 MIC 为 $0.49 \mu\text{g/ml}$,为所用实验药物的最低值。土霉素为 $0.98 \mu\text{g/ml}$,吡呱酸 $1.95 \mu\text{g/ml}$,呋喃唑酮 $3.90 \mu\text{g/ml}$,氯霉素 $7.8 \mu\text{g/ml}$,呋喃妥因 $7.8 \mu\text{g/ml}$,TMP (Trimothoprimi) $62.5 \mu\text{g/ml}$ 。上述药物对该病菌的 MBC 多数情况下是其 MIC 的 2 倍,少数为其 MIC 的 8 倍。

3. 药物的联合作用 表 3 列出几种药物联用时对菌株 Z8809 的抑菌结果。结果表明,四环素与土霉素、氯霉素与 TMP、四环素与 TMP、呋喃唑酮与 TMP 联用时表现出协同作用;呋喃妥因与土霉素、吡呱酸与土霉素联用时表现为拮抗作用;土霉素与 TMP 联用为无关结果。

表2 实验药物对 Z8809 菌株的 MIC 与 MBC 值(μg/ml)

Table 2 The MIC and MBC of some drugs against the strain Z8809(μg/ml)

项目	TMP	呋喃妥因	呋喃唑酮	氯霉素	吡呱酸	土霉素	四环素	磺胺
MIC	62.5	7.8	3.9	7.8	1.95	0.98	0.49	8
MBC	125	15.6	7.8	15.6	3.90	1.96	0.98	64

表3 几种药物的联用效果

Table 3 The effects of the combination of several pair of drugs towards the strain Z8809

项目	素/素		素/素		因/素		素/素		酸/素		酮/素		素/素	
	环/土	土/TMP	土/TMP	土/TMP	妥/土	土/TMP	氯/TMP	氯/TMP	呱/土	土/TMP	唑/土	土/TMP	环/TMP	环/TMP
联合前 MIC 值	0.49/0.98	0.98/62.5	7.8/0.98	7.8/62.5	1.95/0.98	3.9/62.5	0.49/62.5							
联合后 MIC 值	0.031/0.49	0.98/62.5	7.8/7.8	1.95/15.6	3.9/1.95	0.98/15.6	0.061/31.25							
增效倍数	16/2	1/1	1/8	4/4	0.5/0.5	4/4	3/2							
FIC 值	0.37	2	8	0.5	4	0.5	0.625							
结果	协同作用	无关	拮抗作用	协同作用	拮抗作用	协同作用	协同作用							

4. 杀菌曲线 药物氯霉素与 TMP 联合时,作用于 Z8809 菌株 24h 内的联合管菌落数较单独管减少 10^6 以上(图1),显示二者有明显的协同作用。药物土霉素与四环素、呋喃唑酮与 TMP、四环素与 TMP 分别联用对该菌作用 24h 后,菌落数均比单独管减少 100 倍以上,也表现出协同作用,证实了表3 实验结果。

5. 菌浓度变化对 MIC 的影响 在菌浓度不同的情况下,测定几种药物的 MIC(表4)。从表4 可见,菌浓度变化引起 MIC 值大小的变化,因药物的不同而异。有些药物对不同浓度所测 MIC 变化不大,如土霉素,当菌浓度为 10^3 cells/ml 时, MIC 为 $0.49\mu\text{g/ml}$;在 10^6 cells/ml 时,为 $0.98\mu\text{g/ml}$;在 10^9 cells/ml 时,为 $1.95\mu\text{g/ml}$ 。而另一些药物,则菌浓度的变化对 MIC 值的影响极大,如呋喃唑酮,菌浓度在 10^9 cells/ml 时, MIC 为 $62.5\mu\text{g/ml}$;而在 10^3 cells/ml 时,仅 $0.02\mu\text{g/ml}$,相差 3125 倍。

6. 药物在海水中的有效作用时间 采用 Z8809 病原菌,测定几种药物在三种不同浓度情况下(1MIC, 4MIC, 16MIC)对该病原菌的有效作用时间受海水影响的情况(表5)。结果表明:在海水环境中,不同药物在 1MIC 时,对 Z8809 病原菌的有效作用时间有不同,如土霉素和四环

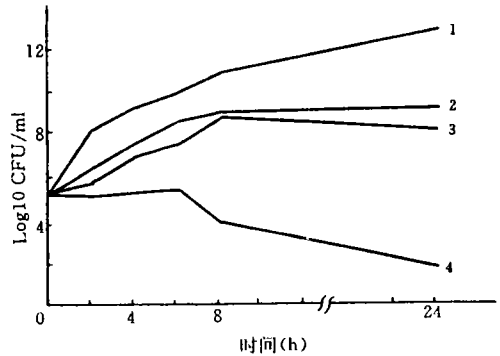


图1 氯霉素与 TMP 联用对 Z8809 菌株的杀菌曲线
Fig. 1 Bacteriocidal curve of the combination of chloramphenicol and TMP against Z8809
1. 对照; 2. 氯霉素; 3. TMP; 4. TMP+氯霉素

素仅6h,而呋喃妥因可达36h,且药物在海水中作用时间随剂量的加大而延长。

表4 菌浓度(cells/ml)对MIC值($\mu\text{g/ml}$)的影响
Table 4 The effects of germ density on MIC($\mu\text{g/ml}$)

菌浓度	10^9	10^6	10^3	a	b
TMP	125	62.5	0.98	2	128
吡呱酸	15.6	1.95	<0.02	8	>780
呋喃妥因	250	7.8	<0.02	32	>1250
四环素	0.98	0.49	<0.02	2	50
氯霉素	62.5	7.8	<0.02	8	>3125
土霉素	1.95	0.98	<0.49	2	4
呋喃唑酮	62.5	3.90	<0.02	16	>3125

注:a. 药物在菌浓度为 10^9cells/ml 时的MIC与菌浓度为 10^6cells/ml 时的MIC之比; b. 药物在菌浓度为 10^9cells/ml 时的MIC与菌浓度为 10^3cells/ml 时的MIC之比。

表5 药物在海水中的有效作用时间(小时)
Table 5 The effective time(h) of some drugs against the germ in seawater

项目	TMP	呋喃妥因	土霉素	四环素	呋喃唑酮
1MIC	12	36	6	6	12
4MIC	36	48	6	12	48
16MIC	48	72	12	36	72

三、讨 论

抗菌药物主要通过抑制致病性微生物细胞的叶酸、肽聚糖、核酸、核糖体、蛋白质等合成,从而达到杀菌或抑菌的目的。在前些时期,抗菌药物在水产养殖动物病害的防治上起到不可忽视的作用。近年来,随着水产养殖业的发展,养殖生产中广泛使用了抗生素,其中存在几个突出的问题,一是不对症下药,乱投滥用药物;二是随意混用药物。养殖水环境中各种抗生素的存在,必然选择性地促进耐药性微生物的生长与繁殖,同时,通过微生物间的接合作用,这些耐药性微生物可以传递具有耐药性基因的R因子给养殖水环境中的药物敏感菌,从而使环境中广泛地分布着耐药性微生物,包括大量的多重耐药菌。这一现象将使以后有效控制疾病几乎成为不可能。显然,在养殖过程中,药物的乱投滥用,其结果不堪设想。

根据本实验结果,我们认为在养殖生产中使用药物时应注意:①对于不同的病原菌或同一病原菌的不同浓度,药物的MIC、MBC值都有所不同。因此水产养殖单位应具备完善的水质检测设备,定时检测养殖水体的微生物种类组成、数量变动情况,以便做到有效防病、针对性对症下药。同时,由于海水一般可以缩短药物的有效作用时间,因此投药时要考虑到海水对药物

的影响,以便掌握持续用药时间。②为了尽可能减少耐药菌的出现和有效控制病情,联合使用药物为一好办法。我们的实验结果表明(表3):联用药物可以大量减少用药量,如单用TMP时,MIC值为62.5ppm,而联合用药时仅需15.6ppm。同时,各种药物的联合使用可以多方面、多途径、低剂量而高效地杀死病菌。但是,联合用药并非是随意混用,而需要有实验依据。本研究结果表明,有些抗生素联用时不但无协同效应,甚至相互拮抗。③任何药物都有一定的毒副作用,并对养殖水环境有多方面的不利影响,因此作者认为,对虾病害的药物处理只是目前不得已的暂时性手段,生态防治才是解决问题的一条好出路。因而,应尽快地开展海水养殖生态学的研究[Aubert m., 1992](Maeda, 1992),尤其是探讨该生态系中主要微生物菌群的作用特点及其对养殖活动的影响和致病菌的致病条件,寻找减少或消除水产养殖环境中病原菌及其它有害菌群生物量的理化方法和生物学方法[Zheng, 1989; 郑天凌, 1990, 1992],优化养殖水域生态系结构,使养殖活动良性循环发展,防止病害发生,从而产生更大的经济效益、生态效益和社会效益。

本研究为国家青年科学基金、福建省自然科学基金及国家教委留学人员资助课题。厦门大学海洋系李少菁教授对本研究给予大力支持并提出宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 方金瑞等, 1991. 养殖对虾弧菌病病原菌研究进展. 福建水产, (3):20-25.
- [2] 朱效斌, 1991. 育苗滥用药物是养殖业发展大滑坡的原因之一. 海洋科学, (3):171-172.
- [3] 郑天凌, 1990. 微型藻类在海水环境自净中的作用. 环境科学学报, 10(2):195-200.
- [4] ——, 1992. 蛭弧菌在虾池生态系中的作用. 海洋科学, (1):70.
- [5] Aubert, M. et al., 1992. Bains de mer et manifestation pathologique. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale*. 105-106, 19-31.
- [6] Moellering R. C. et al., 1971. Prevalence of high level resistance to aminoglycoside in clinical isolates of enterococci. *J. Infect. Dis.*, 124(suppl.):207-210.
- [7] Zheng T. L. 1989. The contribution of some marine micro-organisms in the decontamination of shellfish. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale*. 93-94, 1-14.
- [8] ——, 1991. Studies on opportunistic pathogens and bacterial flora in the P. majorrearing water environment. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale* 101-104, 78-82.

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE CONTROLLING OF EFFECTIVE DRUGS TOWARDS THE PRAWN VIBRIOSIS

Zheng Tianling, Chen Ying, Li Fudong and Cai Lizhe

(Xiamen University, 361005)

ABSTRACT The antibacterial activity of 24 kinds of drug towards prawn vibriosis caused by vibrio(Z8809) was studied. The minimal inhibition concentration (MIC) and the minimal

(2) Maeda, M., 1992. Ecological activities of micro-organisms and protozoa related to biological and fish growth promotion. Sixth ISNE, 53.

bacteriocide concentration (MBC) of some drugs against the disease, the effective time of the drugs towards the strain in seawater, and the effect of germ concentration on the value of MIC were reported in this paper. The consequences resulting from incorret use of drug were discussed. Emphases were put on the importance and urgency of practising the technique of ecological control in preventing and curing microbial disease of *Penaeus*.

KEYWORDS prawn vibriosis, effective drug, *Penaeus*

1995年度《大连水产学院学报》征订

大连水产学院是我国重要的水产教育与科研基地之一。本院主办的大连水产学院学报,是以水产科学为主的学术性期刊,具有较高的理论水平和一定的实用价值及信息价值,适合各水产教育、科研、生产单位及广大从事水产科学的研究人员订阅。

本刊刊登的主要内容有:水生生物、水产增养殖、水产捕捞和航海、水产品加工、渔业机械和轮机管理、渔业电子、渔船设计与制造、渔港设计与建筑及数、理、化等学科的研究论文与研究简报。

本刊公开发行,全年定价6元(含邮费)。另外,本刊尚有部分过期期刊,数量有限,欢迎订阅。

汇款地址:大连市黑石礁大连水产学院学报编辑部;邮政编码:116024。

1995年度《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统唯一的一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院信息研究所主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地以各种形式出版的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量约3000条。每年第一期刊登本刊引用主要期刊一览表,年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行。每期定价8.00元,全年六期共48.00元。邮发代号18 126,请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。如在当地邮局订阅不便,也可向本刊编辑部办理邮购。

编辑部地址:北京市永定路南青塔村150号;邮政编码:100039。