

中华绒螯蟹细菌病防治药物研究

林春友 张勤 冯守明 傅志茹 时建伟

(天津市水产研究所, 天津 300221)

中华绒螯蟹(河蟹)的细菌病是一种危害较大的蟹病,在发病严重的蟹池中,其感染率高达 50% 以上,严重影响了河蟹养殖业的发展。目前,在蟹类细菌病防治药物研究方面,国内外报道很少,因此,开展此项研究显得尤为重要。

1994—1995 年,我们利用河蟹烂鳃病、甲壳溃疡病的致病菌株进行了河蟹细菌病防治药物的研究工作,研制出治疗河蟹细菌病较为有效的药物——“蟹服康”。该药是中西药结合的复方制剂,它克服了药物单一所造成的抗菌谱窄、易产生耐药性的缺陷,并且具有诱食、促进生长等作用。经生产应用表明,此药具有抗菌谱广、高效、低毒、河蟹喜食、促进生长等特点,对河蟹细菌病的治愈率达 70% 以上。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物来源 实验用抗菌药物为市售药物、药敏纸片购自中国药品生物制品检定所、“蟹服康”由本课题组研制。

1.1.2 试验菌株 959211—非 O1 霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、959213—副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、959216—温和产气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、959217—豚鼠产气单胞菌(*Aeromonas caviae*)。

由天津市卫生防病中心和本研究组分离于本地患烂鳃病、甲壳溃疡病的病蟹。由天津市卫生防病中心细菌检验科沈宗林副主任医师鉴定。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感实验 采用改良的 Kirby—Bauer(K—B)氏法。28℃ 恒温培养 24h,观察抑菌圈的有无和大小。

1.2.2 “蟹服康”成份 A、B 对试验菌株的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定。

采用试管 2 倍稀释法。将药物原液 0.1ml 加入第一管中,使其浓度为 50μg/ml,倍比稀释,使各管药物浓度分别为 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.1μg/ml, 加入菌

液, 28℃ 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。

1.2.3 “蟹服康”成份 A 与 B 的联用实验 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 A 药 MIC 值/联用前 A 药 MIC 值 + 联用后 B 药 MIC 值/联用前 B 药的 MIC 值 = $FIC_A + FIC_B = FIC$ 指数。当 FIC 指数 ≤ 0.75 时, 则两种药物为协同作用; FIC 指数 = 1 时, 两药为相加作用; 当 $1 < FIC$ 指数 < 2 时, 为无关; 当 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 指数 < 0.5 则认为两药有显著协同作用。

1.2.4 “蟹服康”对试验菌株的最小抑菌浓度 (MIC)、最小杀灭浓度 (MBC) 的测定 测定方法同 1.2.2 (略)。

1.2.5 “蟹服康”的效果试验 为了验证“蟹服康”对细菌性蟹病的防治效果, 在生产上我们进行了治疗试验和预防试验。

1) 治疗试验 将“蟹服康”制成药饵投喂发病蟹, 药物添加量为 1%。投喂鲜料时, 每 25Kg 饵料加“蟹服康”100g 焖制 10 分钟后投喂, 治疗期间换水 10cm, 7 天一个疗程。

$$\text{治愈率} = \frac{\text{治疗前死亡率} - \text{治疗后死亡率}}{\text{治疗前死亡率}} \times 100\%$$

2) 预防试验 到高温季节, 每隔 8—10 天投喂一个预防疗程的药饵, 每个预防疗程三天, 合成饵料中药物添加量为 1%, 鲜料中药物添加量为 0.4%。观察预防效果。

2 实验结果

2.1 药物敏感实验

用改良的 K—B 氏法测定 35 种抗菌药物对试验菌株的药敏实验结果见表 1。

表 1 不同药物对试验菌株的抗菌活性 (抑菌直径: MM)

抑菌直径及敏感度		试验菌株			
抗菌药物及其含量		959211	959213	959216	959217
氨基糖苷类	丁胺卡那霉素 Amikacin 30ug/片	17(s)	20(s)	20(s)	18(s)
	庆大霉素 Gentamicin 10ug/片	21(s)	20(s)	19(s)	24(s)
	卡那霉素 Kanamycin 30ug/片	20(S)	20(S)	16(S)	19(S)
	链霉素 Streptomycin 10ug/片	20(S)	18(S)	16(M)	12(M)
	新霉素 Neomycin 30ug/片	27(S)	20(S)	20(S)	22(S)
	妥布霉素 Tobramycin 10cg/片	20(S)	19(S)	16(S)	20(S)

• 天津水产 • 1996 年

抗菌药物及其含量		试验菌株	959211	959213	959216	59217
抑菌直径及敏感度						
青霉素类	青霉素 G Penicillin G 10RU/片		23(M)	—(R)	—(R)	13(R)
	氨苄青霉素 Ampicillin 10ug/片		21(R)	—(R)	—(R)	20(M)
	羧苄青霉素 Carbenicillinug/片		24(S)	—(R)	—(R)	18(M)
四环素类	四环素 Tetracycline 30ug/片		28(S)	28(S)	12(R)	12(R)
	强力霉素 Doxycycline 30ug/片		26(S)	21(S)	19(S)	20(S)
头孢类	头孢呋新 Cefuroxime 30ug/片		27(S)	18(S)	38(S)	30(S)
	头孢三 Ceftriaxone 30ug/片		30(S)	30(S)	42(S)	38(S)
	头孢噻吩 Cephalothin 30ug/片		23(S)	17(M)	25(S)	22(S)
	头孢噻甲肟 Ceftezidime 30ug/片		30(S)	28(S)	10(S)	38(S)
	头孢唑苄 Cefalexin 30ug/片		18(S)	15(M)	22(S)	18(S)
	头孢拉定 Cefradine 30ug/片		19(S)	14(R)	18(S)	18(S)
内酯类	红霉素 Erythromycin 15ug/片		22(S)	28(S)	16(M)	24(S)
	乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin 15ug/片		—(R)	—(R)	—(R)	—(R)
多肽类	杆菌肽 Bacitracin 0.04IU/片		—(R)	—(R)	—(R)	—(R)
	去甲万古霉素 Norvancomycin 30ug/片		—(R)	—(R)	—(R)	—(R)
	多粘菌素 B polymyxin R300IU/片		—(R)	13(S)	18(S)	9(M)
	新生霉素 Ovobiocin 5ug/片		20(M)	—(R)	—(R)	—(R)
抗生素	氯霉素 Chloramphenicol 30ug/片		33(S)	30(S)	21(S)	30(S)
	氯洁霉素 Clindamycin 2ug/片		14(R)	—(R)	—(R)	—(R)
	利复平 Rifampicin 5ug/片		24(S)	21(S)	20(S)	22(S)
磺胺类	磺胺甲基异噁唑 Sulfamethoxazole 300ug/片		26(S)	20(S)	—(R)	—(R)
	复方新诺明 SXT 25ug/片		28(S)	20(S)	20(S)	22(S)
呋喃类	呋喃妥因 Nitrofurantoin 300ug/片		23(S)	15(M)	23(S)	29(S)
	呋喃唑酮 Furazolidon 300ug/片		23(S)	15(M)	20(S)	28(S)
喹诺酮类	氟哌酸 Norfloxacin 10ug/片		36(S)	34(S)	25(S)	30(S)
	氧氟哌酸 Ofloxacin 5ug/片		32(S)	27(S)	24(S)	28(S)
	甲氧哌酸 Pefloxacin 10ug/片		33(S)	27(S)	25(S)	30(S)
	环丙氟哌酸 Ciprofloxacin 5ug/片		38(S)	32(S)	30(S)	33(S)
	吡哌酸 Pipemidic acid 30ug/片		30(S)	21(S)	20(S)	4(S)

注：“S”表示敏感；“M”表示中度敏感；“R”表示耐药。

根据“抗菌药物敏感实验判断标准”判断,35 种药物中对 959211 敏感的药物有 31 种,占 88.6%;对 959213 敏感的药物有 26 种,占 74.3%;对 959216 敏感的药物有 25 种,占 71.4%;对 959217 敏感的药物有 27 种,占 77.1%。所有试验菌株(除 959213 对头孢拉定耐药外)对头孢类药物均敏感。对所有致病菌均敏感的药物有氨基糖苷类、喹诺酮类、呋喃类药物以及强力霉素、红霉素、氯霉素、利复平、复方新诺明。

2.2 “蟹服康”成份 A、B 对试验菌株 MIC、MBC 的测定

根据药敏实验结果,我们选择抗菌谱较广、抗菌能力较强且价格低廉的药物 A、B 做为“蟹服康”的主要成份。

“蟹服康”成份 A、B 对试验菌株的 MIC、MBC 测定结果见表 2。

表 2 “蟹服康”成份 A、B 对试验菌株的 MIC、MBC 值

MIC MBC 药物	试验菌株	959211	959213	959246	959217
A		0.78	0.39	12.5	0.78
		0.78	0.39	25	0.78
B		0.2	1.56	0.78	0.39
		0.39	3.12	0.78	0.78

药物 A 对 959213 的最小抑菌浓度最低,为 $0.39\mu\text{g/ml}$ 。药物 A 对 959211、959216、959217 的最小抑菌浓度分别为 0.78、12.5、 $0.78\mu\text{g/ml}$ 。药物 B 对 959211 的 MIC 值最小,为 $0.2\mu\text{g/ml}$,对 959213、959216、959217 的 MIC 分别为 1.56、 $0.78\mu\text{g/ml}$ 。药物 A、B 对各病原菌的 MBC 是其 MIC 的 1—2 倍。由表 2 可见,药物 A、药物 B 对烂鳃病、甲壳溃疡病致病菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度均较低,从而证明了“蟹服康”成份具有较强的杀菌能力。

2.3 “蟹服康”成份 A、B 的联合实验

A、B 两种药物联用效果见表 3。

表 3 药物 A、B 对致病菌的联用效果

项目	试验菌株	959211	959213	959216	959217
联合前的 $\text{MIC}_A/\text{MIC}_B$ 值		0.78/0.2	0.39/1.56	12.5/0.78	0.78/0.39
联合后的 $\text{MIC}_A/\text{MIC}_B$ 值		0.07/0.14	0.07/0.14	0.30/0.57	0.04/0.07
增效倍数		11/1.4	5.5/11	41.5/1.4	19.5/5.5
FIC 指数		0.79	0.27	0.75	0.23
结 果		相加作用	协同作用	协同作用	协同作用

结果表明,药物 A、B 联用时,对 959211 表现出相加作用,对 959213、959216、959217 均表现出协同作用,尤其对 959213 和 959217 表现出显著的协同作用。这充分说明,A、B 两种药物的联用不仅克服了使用单一药物所造成的抗菌谱窄、易产生耐药性的缺陷,而且大大提高了药物 A、B 自身的杀菌能力,从而大大提高了药效。

2.4 “蟹服康”对致病菌 MIC、MBC 的测定

测定“蟹服康”对致病菌株的 MIC、MBC 有助于我们确定其治疗浓度。“蟹服康”对四株致病菌的 MIC、MBC 测定结果见表 4。

表 4 “蟹服康”对致病菌株的 MIC、MBC 值 单位: us/ml				
菌 株	959211	959213	959216	959217
MIC	0.39	0.39	1.56	0.2
MBC	0.39	0.39	3.12	0.39

“蟹服康”对 959217 的 MIC 值最低为 $0.2\mu\text{g/ml}$, 对 959211、959213、959216 的 MIC 值分别为 $0.39, 0.39, 1.56\mu\text{g/ml}$, 对各致病菌株的 MBC 分别是其 MIC 的 1—2 倍。

2.5 “蟹服康”的效果试验

2.5.1 治疗试验 1) 试验池概况 天津市北辰区霍庄乡赵庄河蟹养殖场 6 号池, 面积 4 亩, 亩放养扣蟹 1750 只, 放养规格 160 只/Kg。1995 年 7 月 25 日, 发生了典型的烂鳃及甲壳溃疡综合症, 发病率为 25%。发病池水质情况见表 5。

表 5 发病池水质情况							
项目	PH	盐度	NH_4^+-N	COD	总硬度	Ca^{2+}	Mg^{2+}
结果	8.2	2.22	1.25	28.32	15	76.15	136.19
		%	mg/L	mg/L	me/L	mg/L	mg/L

2) 治疗方法 将“蟹服康”制成药饵投喂, 药物添加量为 1%; 投喂鲜料时, 每 50 公斤饵料加 200g“蟹服康”, 焖制十分钟后投喂。连续投喂一个疗程(7 天), 每天换水 10—15cm。

3) 治疗效果 投喂“蟹服康”药饵 4 天后, 河蟹停止死亡, 7 天后, 病蟹基本痊愈, 河蟹活动及摄食情况恢复正常。至养殖结束, 该池亩产河蟹 60Kg, 规格达 10—12 个/Kg, 产值 3.1 万元, 盈利 1.8 万元, 挽回经济损失 5000 元。

2.5.2 预防试验 1995 年 7 月 25 日, 我们对赵庄河蟹养殖场 1、2、3、4、5、6 号蟹池进行了防病试验, 也收到了满意的效果。

1) 试验池概况 试验池基本情况见表 6。

2) 预防方法 成蟹养殖池到高温季节, 每隔 8—10 天投喂一个预防疗程的药饵, 每个预防疗程为 3 天, 合成饵料中药物添加量为 1%; 鲜料中药物添加量为 0.4%, 将药物与鲜料混匀焖制十分钟后投喂。

扣蟹养殖池养殖过程中一般投喂鲜料, 药物添加量为 0.4%, 混匀焖制十分钟后投喂。

表 6 试验池基本情况

池 号	养殖类型	亩 数	放养量
1	扣蟹养殖	7	大眼幼体 5kg
2	扣蟹养殖	10	大眼幼体 7.5kg
3	扣蟹养殖	15	大眼幼体 10kg
4	成蟹养殖	1	扣蟹 1.2 万只
5	扣蟹养殖	10	大眼幼体 9kg
6	成蟹养殖	4	扣蟹 0.7 万只

3) 预防试验结果 自预防试验开始至养殖结束, 进行预防试验的河蟹未发现细菌性蟹病。尤其是 6 号池, 在 7 月下旬发生的细菌性蟹病治愈后, 采取了以上预防措施, 至养殖结束没有复发细菌病。通过预防试验, 各试验池均获得了较好的收益。现将 1 号、4 号、6 号池河蟹产量情况列于表 7。

表 7 预防试验池河蟹产量统计

池号	总产量 kg	亩产 kg/亩	规格 个/kg	产值 万元/亩	盈利 元/亩
1	391	55.5	240	1.07	3355
4	312	78	9	1.05	2625
6	240	60	10	0.78	1950

2.5.3 “蟹服康”推广应用效果 1994—1995 年, 先后在宁河县、北辰区、塘沽区、武清县等养蟹单位进行防治试验, 均收到了较好的防治效果, 防治有效率达 90% 以上, 治愈率达 70% 以上, 为生产单位挽回经济损失 10 多万元, 养殖户普遍反映“蟹服康”是防治河蟹细菌病的一剂良药, 具有广阔的应用前景。

参考文献

- ①上海医学化验所编. 抗生素药物敏感试验. 1983
- ②李景林等. 临床医学检验手册. 长春: 吉林科学出版社, 1989(4)50—56
- ③杨履渭等. 微生物学及检验技术. 广州: 广东科技出版社, 1986
- ④中国药品生物制品检定所, 卫生部抗菌药物细菌耐药监测中心编制. 抗生素药物敏感试验判断标准. 1981
- ⑤Moellering R. C. et al., 1971. Prevalence of high level resistance to aminoglycoside in clinical isolates of enterococci, J. Infect. Dis., 124 (suppl.): 207—210