

半咸水、海水对几种渔用抗菌药物药效的影响

李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

随着我国海水养殖业以及盐碱水域养殖业的蓬勃发展, 鱼类病害问题已相当严重, 而且抗菌药物的使用与淡水养殖中同样普遍。然而, 有关海水、半咸水对抗菌药物药效的影响我们所知甚少, 相关的研究报道鲜见, 给这类药物在海水或盐碱水域的合理使用带来困难, 因此开展这课题的研究显得十分必要。

喹诺酮类化合物, 如萘啶酸、[□]恶喹酸、氟甲喹、吡哌酸等在国外水产上用以治疗细菌性鱼病已有多年的历史。近年来又不断地引入新一代氟喹诺酮类药物, 到目前为止研究较多的药物有: 甲氧[□]恶喹酸(Miloxacin)、氟啶酸(enoxacin)、氟嗟酸(ofloxacin)、氟哌酸(norfloxacin)、环丙氟哌酸(ciprofloxacin)、恩诺沙星(enrofloxacin)、sarafloxacin、双氟沙星(Difloxacin)等, 而这类药物在我国水产养殖上的使用却是 90 年代以后才开始的, 其中使用较多较早的药物主要有氟哌酸、氟啶酸(依诺沙星)、环丙氟哌酸(环丙沙星)等, 这些药物已成为当前我国水产养殖中的主要抗菌药物。与此同时, 氯霉素、土霉素、四环素、呋喃唑酮以及磺胺等药物也仍然是我国水产养殖中目前使用广泛的药物, 为此本研究以这些药物为对象, 探讨海水、半咸水对其抗菌活性的影响, 以便为合理地在上述水型中使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株: *Aeromonas hydrophila* XS91-4-1 和 *Vibrio fluvialis* 91-24-3 均为本实验室保存的菌种, 为淡水养殖鱼类细菌性败血症病原, 采用 2×YT 培养基 (0.5% NaCl)。

半咸水: 取自山东省淄博市高青县, 盐度为 2—3‰, pH8.1—8.3, 高压灭菌。

人工海水: 用海水素 (汕头特区南澳县海水元素制造厂) 配制而成, 浓度为 2.5%, 高压灭菌, pH6.8—7.0。

试验药物: 环丙沙星、土霉素、四环素、氯霉素、呋喃唑酮、磺胺甲基异[□]恶唑。

1.2 实验设计及方法

所有试验药物均按其不同的性质, 先采用不同的溶剂配制成贮存液, 然后, 分别用蒸馏水、生理盐水、半咸水和人工海水将环丙沙星配制成 50 μg/ml 的使用液, 0.45 μm 过滤除菌。在室温下放置 2h, 然后置 4℃ 保存备用 (1 周内用完)。

该试验分两步进行。首先, 以环丙沙星为研究对象, 以蒸馏水、生理盐水和海水 3 种溶剂配制的环丙沙星对蒸馏水、生理盐水和海水 3 种试验介质进行交叉试验, 以研究配制药物的溶剂对环丙沙星抗 2 种病原菌的影响。然后, 以蒸馏水配制环丙沙星、氯霉素、四环素、土霉素、呋喃唑酮及磺胺药, 以蒸馏水、生理盐水和海水作为抑菌试验介质, 测定它们对 2 种试验菌的 MIC。MIC 采用微量双倍稀释法 (平底 96 孔板) 测定。

2. 结果

2.1 配制药物的溶剂对环丙沙星 MIC 的影响。

将 3 种不同的配制方法与 3 种试验介质溶液进行了交叉试验, 结果见表 1。从中可以看出三层意义。

一方面, 虽然以蒸馏水、生理盐水和海水所配制的药液在蒸馏水作为介质时所测得抗 *A. hydrophila* 的 MIC 存在一些差别, 但总的说来, 以不同溶液配制的药物在同一种试验介质溶液中所测结果无明显变化, 而且 3 种介质都有同样的表现。因为, 从表 1 中可以看出, 以蒸馏水为抑菌试验的介质溶液, 3 种方法配制的环丙沙星对 *V. fluvialis* 的 MIC 一致, 均为 $0.0061 \mu\text{g/ml}$; 以生理盐水作为测定 MIC 的介质, 3 种方法配制的药物对 2 种试验菌的 MIC 基本无影响, 只是以海水配制的药物对 *A. hydrophila* 有轻度影响, 而对 *V. fluvialis* 则完全无影响。以海水作为介质, 3 种配制方法所得结果也很接近。对 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 的 MIC 分别为 $0.0488-0.0976 \mu\text{g/ml}$ 和 $0.0122-0.0244 \mu\text{g/ml}$ 。这说明, 只要试验的介质溶液相同, 那么配制方法对药效无明显影响。

表 1 配制药物的溶剂对环丙沙星抑菌效果的影响

Table 1 Effect of dissolvent on inhibitory activity of ciprofloxacin against 2 fish bacterial pathogens

MIC 测定的介质	配制药物的溶剂 (使用液)	MIC($\mu\text{g/ml}$) against	
		<i>A. hydrophila</i>	<i>V. fluvialis</i>
蒸馏水	蒸馏水	0.0122	0.0061
	0.85%的生理盐水	0.0488	0.0061
	盐度为 2.5%的海水	0.0061	0.0061
0.85%的生理盐水	蒸馏水	0.0122	0.0244
	0.85%的生理盐水	0.0122	0.0244
	半咸水	0.0122	0.0244
	盐度为 2.5%的海水	0.0244	0.0244
海水	蒸馏水	0.0976	0.0244
	0.85%的生理盐水	0.0976	0.0122
	盐度为 2.5%的海水	0.0488	0.0244

其次, 鉴于用蒸馏水和海水配制的药液, 在以蒸馏水为介质测定 MIC 时所得结果相近, 这说明钙离子或镁离子与环丙沙星的结合, 虽然可降低抑菌或杀菌活性, 但这种作用却是可逆的, 一旦用蒸馏水稀释后, 环丙沙星将从结合状态逐渐转变为游离状态, 又恢复杀菌活力。这是本试验又一个有意义的结果。

最后, 从表 1 中还可以看出, 如果配制药液的溶剂相同, 而测定 MIC 时的介质溶液不同, 那么环丙沙星的药效将受到影响, 生理盐水和海水都可使环丙沙星对鱼类病原细菌的 MIC 升高。因为, ① 以蒸馏水配制的药液, 在上述 3 种介质溶液中测定其 MIC, 结果表明, 对 *A. hydrophila* 的 MIC 值依次为 $0.0122 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0122 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0976 \mu\text{g/ml}$, 在海水中测得的 MIC 比在蒸馏水中测得的值分别提高了 8 倍, 而在生理盐水中则无变化; 对 *V. fluvialis* 的 MIC 值依次为 $0.0061 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244 \mu\text{g/ml}$, 在生理盐水和海水中测得的 MIC 比在蒸馏水中测得的值均提高了 4 倍。② 以生理盐水配制的环丙沙星, 在蒸馏水、生理盐水和海水等 3 种介质中测定的 MIC 分别为 0.0488

$\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0122\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0976\mu\text{g/ml}$ (*A. hydrophila*); $0.0061\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0122\mu\text{g/ml}$ (*V. fluvialis*), 生理盐水和海水对其抑菌作用均有不同程度的影响。③ 以海水配制的药液, 在上述 3 种介质溶液中测定其 MIC, 结果表明, 对 *A. hydrophila* 的 MIC 值依次为 $0.0061\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0488\mu\text{g/ml}$, 在生理盐水和海水中测得的 MIC 比在蒸馏水中测得的值也分别提高了 4—8 倍; 对 *V. fluvialis* 的 MIC 值依次为 $0.0061\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244\mu\text{g/ml}$ 、 $0.0244\mu\text{g/ml}$, 分别提高了 4 倍。

这些结果充分说明, 生理盐水和海水对环丙沙星的药效存在显著影响, 而海水的影响更为明显。这是本试验又一有意义的结果。

本试验结果经方差分析表明: 对于 *A. hydrophila*, 测定 MIC 的 3 种介质间 $P < 0.05$, 这表明 MIC 测定的 3 种介质间对环丙沙星杀灭 *A. hydrophila* 的药效有显著影响; 3 种溶剂间的 $P > 0.05$, 这表明药物的溶剂对药效无显著影响。同样, 对于 *V. fluvialis* 试验组, 测定 MIC 的 3 种介质间 $P < 0.05$, 这表明 MIC 测定的 3 种介质间对环丙沙星杀灭 *V. fluvialis* 的药效有显著影响; 3 种溶剂间 $P > 0.05$, 这再次表明药物的溶剂对药效无显著影响。

2.2 MIC 测定的介质对药物抗菌活性的影响

表 2 是人工海水、半咸水及 0.85% 的盐水对 6 种常用药物抗菌作用的影响试验结果, 从中可以发现: 1) 本试验所采用的半咸水对环丙沙星的影响不明显; 生理盐水可使环丙沙星对 *V. fluvialis* 的 MIC 升高 4 倍, 而对 *A. hydrophila* 的抑菌作用却没有影响, 可见对不同菌种的影响是不同的; 海水对环丙沙星的抑菌作用影响最为显著, 对 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 的 MIC 分别由 $0.0122\mu\text{g/ml}$ 和 $0.0061\mu\text{g/ml}$ 上升为 $0.0976\mu\text{g/ml}$ 和 $0.0244\mu\text{g/ml}$, 分别升高了 8 倍和 4 倍。这些结果再次证明了上一个试验 (见表 1) 的结论。这说明不仅海水可显著影响喹诺酮类药物的药效, 而且较高浓度的钠离子 (生理盐水) 对喹诺酮类药物的药效也有一定影响。Barnes, Hastings (1995) 的结果证明镁离子可影响喹诺酮类药物的药效, 我们的结果与其是吻合的, 因为海水中含有高浓度的镁离子, 但低浓度时 (半咸水) 影响不明显, 2) 氯霉素的情形与环丙沙星相似, 盐水和半咸水对氯霉素无影响, 而以海水作 MIC 测定的介质时, MIC 值均上升为 $0.78125\mu\text{g/ml}$, 对两种试验菌株的 MIC 分别上升了 4 倍和 2 倍。说明在海水养殖中使用时应将常规用量增加 1—2 倍, 才能发挥疗效。3) 盐度为 0.85% 的生理盐水对四环素的抑菌效果没有影响; 而半咸水和海水均可使四环素的药效降低 1 倍, 对两种试验菌的 MIC 均分别由 $3.125\mu\text{g/ml}$ 上升为 $6.25\mu\text{g/ml}$ 。4) 生理盐水对土霉素的作用无影响, 而半咸水和海水对土霉素的药效影响显著, 其中海水的影响又比半咸水更明显, 说明二价的阳离子对土霉素有影响, 且与其浓度成正相关。这和四环素的情形相同。以半咸水作 MIC 测定的试验介质, 对两种试验菌的 MIC 由 $0.78\mu\text{g/ml}$ 和 $1.56\mu\text{g/ml}$ 均上升到 $6.25\mu\text{g/ml}$, 分别升高了 8 倍和 4 倍; 以海水作试验介质, 那么土霉素的药效下降 32—16 倍, 对 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 的 MIC 上升为 $25.0\mu\text{g/ml}$, 临床上口服使用将失去治疗作用。这一结论与 Barnes 等 (1995) 的结果完全一致, 所以这一问题在生产上应加以重视。5) 生理盐水对磺胺甲基异恶唑抑制 *A. hydrophila* 的作用有一定影响, 但对抑制 *V. fluvialis* 的 MIC 没有影响。半咸水和海水可使磺胺甲基异恶唑的药效下降 2—4 倍。这一结果与其他学者报道的有差别 (Barnes, Hastings, et al, 1995), 他们在培养基中添加 50mm MgCl_2 后试验发现, 磺胺药的 MIC 没有变化, 他们由此得出海水对磺胺药效没有影响的结论。6) 以生理盐水、半咸水或海水作为试验介质对呋喃唑酮的 MIC 没有影响。说明在半咸水或海水中使用与在淡水中使用会同样有效。

表2 海水、半咸水对6种抗菌药物抑菌效果的影响

Table 2 Effect of seawater, brackish water on inhibitory abilities of 6 antibacterials against 2 fish bacteria

抗菌药物 Antibacterials	MIC测定的介质 Medium for determining of MIC	MIC(μ g/ml) against	
		<i>A. hydrophila</i>	<i>V. fluvialis</i>
环丙沙星 Ciprofloxacin	蒸馏水	0.0122	0.0061
	生理盐水	0.0122	0.0244
	半咸水	0.0122	0.0061
	海水	0.0976	0.0244
氯霉素 Chloramphenicol	蒸馏水	0.1953	0.3906
	生理盐水	0.1953	0.1953
	半咸水	0.1953	0.3906
	海水	0.78125	0.78125
四环素 Tetracycline	蒸馏水	3.125	3.125
	生理盐水	1.560	1.560
	半咸水	6.25	6.25
	海水	6.25	6.25
土霉素 Oxytetracycline	蒸馏水	0.78	1.56
	生理盐水	0.78	0.78
	半咸水	6.25	6.25
	海水	25.0	25.0
呋喃唑酮 Furazolidone	蒸馏水	0.078	3.125
	生理盐水	0.078	3.125
	半咸水	0.039	3.125
	海水	0.078	3.125
磺胺甲基异恶唑 Sulfamethoxazole	蒸馏水	78.125	78.125
	生理盐水	156.25	78.125
	半咸水	312.5	312.5
	海水 Seawater	312.5	156.25

可见,水质的高盐度(如生理盐水、半咸水和海水)对多数药物的抗菌作用有不同程度的影响,这种影响与细菌的种类也有关系。关于半咸水或海水对氯霉素、四环素和呋喃唑酮药效的影响,我们尚未见其它学者的报道。

2 讨论

研究海水和半咸水对药物的影响在医学上没有必要,而对于水产药物却具有重要意义。从本试验研究结果看,喹诺酮类、四环素类、氯霉素以及磺胺药等均不同程度地受海水或半咸水的影响,只呋喃唑酮不受影响。生理盐水对有些药物也有不同程度甚至不同性质的影响。这些结果说明在海水养殖和盐碱地水域使用抗菌药物时,应考虑水质对药物药效的影响,适当加大剂量或选用其它不受这类水质条件影响的药物,否则可能会导致治疗失败。此外,在进行药物敏感性试验时应注意使用何种试验介质,如使用不当,会对试验结果造成严重影响。

本试验测定 MIC 时, 介质中海水或半咸水的最终浓度只有起始浓度的 1/4, 这是由于用于测试的试验菌株属于淡水菌, 直接使用海水浓度会对细菌生长产生严重影响, 可见如果能采用海水鱼类病原菌来测定可能更为合适。

参考文献

1. Barnes AC, Hastings TS, et al. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18: 463-465.
2. Davis BD, Dulbecco R, et al. *Microbiology including immunology and molecular genetics*. Third edition. Harper & Row Publishers, Hagerstown. 1980, pp111-136.
3. Gerhardt P, Murray RGE, et al. *Manual of Methods for General bacteriology*. American society for Microbiology, Washington, 1981, pp228, pp270.
4. Martinsen B & Horsberg TE. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo Salar*) held in seawater at 10 degrees °C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39: 1059-1064.
5. 徐伯亥, 殷战等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究. *水生生物学报*, 1993, 17: 259-266.