

氟苯尼考对大黄鱼的急性毒性及体外抑菌试验

李思源¹, 邢晨光¹, 李 凯², 吕永林², 王国良¹

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 温州市渔业技术推广站, 浙江 温州 325003)

摘要:采用倍比稀释法,研究氟苯尼考对哈氏弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌等8种大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)致病弧菌的体外抑菌效应;同时以棋盘微量稀释法进行五倍子、黄连、乌梅与氟苯尼考的联合用药试验,并研究了该药对养殖大黄鱼的急性毒性效应。结果表明,氟苯尼考对所选弧菌的最小抑菌浓度(MIC)在0.39~0.78 μg/mL,且其MBC值与MIC值相等或为对倍关系;联合用药显示,MIC值比单独使用时略有降低,FIC指数为1.00~0.75,其中以氟苯尼考和五倍子的协同作用最为显著;氟苯尼考口服给药对大黄鱼具有较高安全性,96 h LD₅₀ > 1 000 mg/kg,对大黄鱼的安全浓度SC > 100 mg/kg。

关键词:氟苯尼考;大黄鱼;体外抑菌;急性毒性

中图分类号:S948 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)03-0132-05

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肉质鲜美、营养丰富,是人们青睐的海产品之一。自从人工育苗获得成功以来,养殖规模迅速扩大,取得了可观的经济效益。但养殖病害尤其是弧菌病的暴发流行给浙江省沿海网箱养殖大黄鱼造成极大的损失。氟苯尼考(flornicol)又称氟甲砜霉素,是一种新型广谱高效抗菌药物,国内外已应用于水产养殖防治细菌性疾病(李秀波等,1999;徐力文等,2005)。由于近几年我国对渔用违禁药物的控制,使氟苯尼考作为防治细菌性疾病的有效药物而广泛应用于海水和淡水养殖中,也是防治大黄鱼弧菌病的常用药物。国外曾报道氟苯尼考对南美白对虾幼体、蓝鳃太阳鱼和虹鳟的急性毒性试验(Williams et al,1992),根据毒性分级标准,试验结果均表明,氟苯尼考属于低毒级(叶钟音,2002)。徐力文等(2005)报道了该药对杂色鲍的急性毒性及组织毒理学的相关研究,但有关氟苯尼考对大黄鱼的急性毒性等研究尚未见报道。本试验探讨了该药对大黄鱼的急性毒性效应,同时研究了氟苯尼考对哈氏弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌等8种大黄鱼致病弧菌的体外抑菌作用,为氟苯尼考在大黄鱼病害防治中的有效应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药物 氟苯尼考原料药(含量99%)由浙江淡水水产研究所渔药厂提供,试验前以双蒸水配成含氟苯尼考1 000 mg/mL浓度的悬浊液备用;88%的无菌生理盐水;丁香酚(Engenol)购自北京正大正元科技有限公司;乙醇为天津永大化学试剂开发中心产品。

1.1.2 菌种 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)2株,编号2000-715-4,200506;哈氏弧菌(*V. harveyi*)2株,编号20050610-H,110g-1;副溶血弧菌(*V. parahaemo-lyticus*)编号20050610-F;河流弧菌(*V. fluvialis*)编号1G0210250-2;麦氏弧菌(*V. Metschnikovii*)编号20050610-M;创伤弧菌(*V. vulnificus*)编号H050815-1,均分离自海水网箱养殖患病大黄鱼。已应用法国生物梅里埃(biomerieux)公司API 20E鉴定系统和编码手册对该菌株进行鉴定。

1.1.3 培养基 MH培养基,中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心。

1.1.4 试验材料 大黄鱼(*Pseudosciaena croceai*)购自浙江省洞头县三盘港海水网箱养殖场,个体健壮,无伤病,体长24~26 cm,体重200~250 g,确定试验前3个月内无用药史。

1.1.5 试验场所 洞头县三盘港自然海域网箱养殖场,海域水温24~26℃,盐度28,试验网箱规格为1.5 m×1.0 m×2.0 m。

收稿日期:2009-09-02

基金项目:农业部公益性行业科研专项(200903029);浙江省科技厅重点攻关项目(2005C23080);温州市科技局科技兴海项目(S20060039)。

通讯作者:王国良。E-mail: wanggl@nbip.net

作者简介:李思源,1987年生,女,湖南怀化人,在读硕士研究生,主要从事水产动物病害防治工作。E-mail: dreamcycles_lsy@163.com

1.2 试验方法

1.2.1 体外抑菌试验

1.2.1.1 药液的制备 分别称取 50 g 中草药, 加入 400 mL 蒸馏水中, 于 50℃ 恒温水浴浸泡 24 h, 砂锅文火煎 30 min, 药汁经 8 层纱布过滤, 滤渣加 300 mL 蒸馏水, 同上煎熬并过滤, 2 次滤液合并, 100℃ 加热浓缩至 50 mL, 即为中草药 100% 原汁 (W/V)。115℃ 灭菌 20 min, 冰箱 4℃ 保存备用。

1.2.1.2 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 的测定 采用试管倍比稀释法测定氟苯尼考及几种中草药对试验菌株的 MIC 和 MBC 值。氟苯尼考原料药以 50% 乙醇溶液溶解后, 再以无菌生理盐水稀释至 0.1 mg/mL 氟苯尼考原药液 (其中乙醇含量不超过 15%)。将 0.1 mL 氟苯尼考原药液加入第一管中, 使其浓度为 100 μg/mL, 倍比稀释至所需管数, 加入菌液, 置 28℃ 培养 24 h。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 48 h, 以无细菌生长的最低浓度为 MBC。

1.2.1.3 药物联用试验 根据每株细菌的 MIC 值, 采用棋盘法确定联合药敏浓度。具体操作同倍比稀释法, 每菌株重复棋盘试验 2 次, 每次共设棋盘 3 个。接种菌量为 1×10^7 CFU/mL。28℃ 孵育 18 ~ 24 h 后观察结果。

1.2.2 急性毒性试验

1.2.2.1 试验组设置 挑选活泼健康的大黄鱼随机分组, 暂养 1 周后开始试验。试验开始前 1 d 停止喂食, 试验期间正常投喂。在自然海域条件下, 按等对数间距法设置 5 个质量浓度梯度组。每 1 个药物质量浓度梯度各放健康大黄鱼 10 尾, 每 1 个浓度设 3 个平行组。

1.2.2.2 试验方法 大黄鱼用 30 mg/L 的丁香酚轻度麻醉后, 以 100、180、320、560、1 000 mg/kg 鱼体重的剂量对大黄鱼进行口灌给药, 确保药物不呕吐者进行试验; 对照组为口灌等量生理盐水。连续观察受试对象的活动状况、中毒及死亡情况, 分别记录各试验组 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的死亡数和死亡率。

1.2.2.3 数据处理 根据氟苯尼考对大黄鱼的急性毒性试验结果, 采用机率单位 - 浓度直线回归, 分别求出各不同药物浓度影响下大黄鱼 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的半致死浓度 LC_{50} 和 95% 的置信区间, 并采用安全浓度常用公式 $SC = 0.1 \times 96 \text{ h } LC_{50}$ 校验氟

苯尼考的安全浓度。

2 结果

2.1 体外抑菌试验结果

2.1.1 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 氟苯尼考对所选的 8 种试验菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 结果见表 1。从药敏结果可见, 氟苯尼考对所选弧菌的 MIC 值在 0.39 ~ 0.78 μg/mL, 且其 MBC 值与 MIC 值相等或仅为对倍关系, 说明该药在抑菌的同时也可起到一定的杀菌作用。

所选的 6 种有较好抗菌效果的中草药对 8 种试验菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 结果见表 2; 挑选 3 种抗菌效果较好的五倍子、黄连、乌梅进行联合药敏试验。

2.1.2 联合药敏试验 棋盘微量稀释方法见表 3, 联合药敏试验 FIC 指数分析见表 4。由表 4 可知, 氟苯尼考与所选中草药的 FIC 指数在 1.00 ~ 0.75 的较多, 相比单独用药, MIC 值略有下降, 但有些已表现无相关性, 其中以氟苯尼考 + 五倍子的联合用药表现较好, 出现协同效应。

表 1 氟苯尼考对大黄鱼病原弧菌的 MIC 值和 MBC 值
Tab. 1 MICs and MBCs values of florfenicol in 8 *Vibrio* spp. isolates of *Pseudosciaena crocea*

菌株名称	最小抑菌	最小杀菌
	浓度 (MIC)/ μg · mL ⁻¹	浓度 (MBC)/ μg · mL ⁻¹
2000-715-4	6.25	12.5
20050610-V	0.78	0.78
20050610-H	0.78	0.78
110g-1	0.78	0.78
20050610-F	0.39	0.78
1G0210250-2	0.39	0.78
20050610-M	0.39	0.78
H050815-1	0.39	0.78

2.2 氟苯尼考对大黄鱼的急性毒性效应

试验分别以 100、180、320、560、1 000 mg/kg 鱼体重的剂量口灌氟苯尼考后, 各试验组鱼活动正常, 无异常情况, 仅高剂量组初期会出现摄食量下降症状, 但很快恢复正常。试验期间, 试验组和对照组均未发现死亡。结果表明, 大黄鱼口灌氟苯尼考的 96 h LD_{50} 均大于 1 000 mg/kg; 依公式计算, 该药对大黄鱼的安全浓度 $SC > 100$ mg/kg。在水产养殖生产中, 氟苯尼考的口服使用剂量为 7 ~ 15 mg/kg。因此, 氟苯尼考口服治疗对大黄鱼具有较高的安全性。

表2 6种中草药对大黄鱼病原弧菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

Tab.2 MICs and MBCs of six Chinese herbs against strain *Vibrio*

菌株名称	五倍子		五味子		公丁香		黄连		乌梅		大黄	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
2000-715-4	1: 640	1: 640	1: 20	1: 10	1: 40	1: 10	-	-	1: 40	1: 40	-	-
20050610-V	1: 640	1: 640	1: 40	1: 40	1: 40	1: 20	1: 320	1: 160	1: 80	1: 80	1: 20	1: 10
20050610-H	1: 320	1: 320	1: 40	1: 40	1: 40	1: 20	1: 160	1: 80	1: 80	1: 80	1: 40	1: 40
110g-1	1: 320	1: 320	1: 40	1: 40	1: 40	1: 20	1: 160	1: 160	1: 60	1: 80	1: 80	1: 40
20050610-F	1: 640	1: 640	1: 40	1: 40	1: 80	1: 20	1: 160	1: 80	1: 80	1: 80	1: 80	1: 80
1G0210250-2	1: 640	1: 640	1: 80	1: 80	1: 160	1: 40	1: 320	1: 160	1: 80	1: 80	1: 320	1: 160
20050610-M	1: 640	1: 640	1: 40	1: 40	1: 80	1: 10	1: 320	1: 160	1: 80	1: 80	1: 80	1: 20

表3 药敏棋盘微量稀释法

Tab.3 The ways of the checkerboard microdilution method

联合用药药物	1/2 MIC(F)	1/4MIC(F)	1/8 MIC(F)
1/2 MIC(C)	第1管	第4管	第7管
1/4 MIC(C)	第2管	第5管	第8管
1/8 MIC(C)	第3管	第6管	第9管

注: C 为中草药, F 为氟苯尼考。

Notes: C means Chinese herbs, F means florfenicol.

表4 联合药敏试验 FIC 分析

Tab.4 The FIC results of the combination antibiotic sensitivity test

菌株名称	FIC 值		
	氟苯尼考	氟苯尼考	氟苯尼考
	+ 五倍子	+ 黄连	+ 乌梅
2000-715-4	0.50	0.50	0.75
20050610-V	0.75	1	>1
20050610-H	0.625	>1	>1
110g-1	0.625	0.75	0.75
20050610-F	0.625	>1	>1
1G0210250-2	>1	>1	>1
20050610-M	>1	>1	>1
H050815-1	0.625	>1	>1

3 讨论

3.1 不同种类的氟苯尼考 MIC 值比较

弧菌是海洋中最为常见的细菌类群,通常被认为是一种条件致病菌(李玉英和李槿年,2003)。弧菌病是大黄鱼养殖中最常见的细菌性疾病,氟苯尼考已成为主要的防治药物,对大多数弧菌具有良好的抗菌活性。目前,关于氟苯尼考体外抗菌活性的研究已有较多报道,其对绝大多数水产动物病原菌以及氯霉素和甲砒霉素耐药菌株均呈高度抗菌活性,对常见病原菌的 MIC 一般为 0.3 ~ 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。高俊岭和高启平(2004)报道,氟苯尼考对鲈鱼爱德华氏菌的 MIC 值为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在体外抑菌试验中对杀鲑气单胞菌的 MIC 值为 0.25 ~ 1.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Grant & Laidler, 1993),对鳗弧菌及杀鲑弧菌的

MIC 值为 0.3 ~ 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fukui et al, 1987),对耶尔森氏菌的 MIC 值为 0.6 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (邱银生和吴佳, 1996),对从患病鳕鱼分离到的溶藻弧菌的 MIC 为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Samuelsen et al, 2003)。本试验结果表明,氟苯尼考对所选的大黄鱼主要病原弧菌均有较好的抗菌效果, MIC 值在 0.39 ~ 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与上述报道基本一致。但氟苯尼考对水产动物同种病原菌的 MIC 值也有差异,曹海鹏等(2007)研究发现,氟苯尼考对副溶血弧菌的 MIC 为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;王晓洁等(2008)研究表明,氟苯尼考对副溶血弧菌的 MIC 为 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而本试验结果中,氟苯尼考对副溶血弧菌的 MIC 为 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$,这可能与菌株差异以及培养条件不同有关(廖昌荣等, 2005)。

3.2 中草药与抗生素的联合药效

越来越多的学者研究中草药与抗生素联合用药对致病菌的作用效果及其安全性(郑天凌等, 1994)。本试验结果表明(表2),选用的6种中草药对试验弧菌均有不同程度的抑制作用,其中,五倍子、黄连、乌梅3种药物的抑菌作用较显著,并以氟苯尼考和五倍子联合用药的效果最为显著。在鱼病防治中,五倍子长期用于水霉病、烂鳃病、赤皮病、败血病、迟钝爱德华氏病、肠炎病、白皮病等多种水生动物疾病的防治(刘松岩等, 2001;汪长友, 2003)。李春远等(2003)曾用五倍子提取物对气单胞菌属、弧菌属等9个海洋污损微生物菌属进行体外抑菌试验,表明均呈较高的体外广谱抗菌杀菌活性。由于中草药具有廉价、来源广、低毒、副作用小、不易产生抗药性等特点,且某些成分既有抗菌作用,又有免疫作用,能改善机体的免疫状态,当与抗生素联合使用时,既可起到协同效应,又可降低药物用量。但需注意,某些中草药在低浓度时反而有促进细菌生长的作用,故应选择适当的药物及合适的用药浓度(金珊等, 2002),正确的用药浓度是既能有效抑制病原菌生长,又不至于损害鱼体。

3.3 氟苯尼考对水产动物的安全性

与消毒剂类药物相比,关于抗菌药物对水产动物的毒性研究报道较少。Inglis & Richards(1991)曾报道,以氟苯尼考10倍口服剂量投喂大西洋鲑苗和幼鲑10~60 d,未见有任何明显的组织器官病变; Gaikowski等(2003)以氟苯尼考10、30、50 mg/kg鱼体重投喂斑点叉尾鲷20 d,也未显示任何临床症状,但30 mg/kg和50 mg/kg剂量组出现摄食量下降; 氟苯尼考对蓝鳃太阳鱼和虹鳟的LD₅₀分别大于830 μg/mL和780 μg/mL(徐力文等,2005)。本研究显示,大黄鱼口灌氟苯尼考的96 h LD₅₀大于1 000 mg/kg,其安全浓度SC > 100 mg/kg,远高于氟苯尼考正常口服使用剂量的10倍以上。因此,氟苯尼考口服治疗大黄鱼疾病具有较高的安全性。

参考文献:

曹海鹏, 闫明, 杨先乐. 2007. 氟苯尼考的体外抑菌作用及其对鲫抗嗜水气单胞菌感染的效果[J]. 渔业现代化, 34(4): 47-50.

高俊岭, 高启平. 2004. 氟苯尼考在水产养殖中的应用[J]. 动物保健, (9): 29.

金珊, 蔡完其, 王国良. 2002. 养殖大黄鱼细菌性疾病的病原研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 21(3): 225~230.

李春远, 郑纪勇, 李秀萍, 等. 2003. 五倍子提取物对海洋污损菌的抑制作用[J]. 中药材, 26(2): 106-109.

李秀波, 石波, 梁萍. 1999. 新型广谱抗菌药-氟苯尼考[J]. 国外动物科学, 26(3): 50-52.

李玉英, 李槿年. 2003. 致病性弧菌致病机理研究进展[J]. 水利渔业, 23(1): 56-57.

廖昌荣, 徐力文, 陈毕生. 2005. 氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究[J]. 水产养殖, 26(4): 1-4.

刘松岩, 向方华, 邹忠生. 2001. 常见中草药的药理作用及其在鱼病防治中的应用[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 11(3): 24-25.

邱银生, 吴佳. 1996. 兽用广谱抗菌药物氟甲枫霉素[J]. 中国兽药杂志, 30(2): 47-48.

汪长友. 2003. 中草药在鱼病防治中的应用[J]. 水产学杂

志, 16(2): 90-93.

王晓洁, 杨立红, 梁建光, 等. 2008. 常用抗菌渔药对副溶血弧菌的作用效果比较[J]. 水利渔业, 28(4): 121-123.

徐力文, 廖昌容, 刘广锋. 2005. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J]. 中国水产科学, 12(4): 512-518.

徐力文, 廖昌蓉, 刘广锋, 等. 2005. 氟苯尼考对杂色鲍的急性毒性及组织毒理学[J]. 大连水产学院学报, 20(4): 295-299.

叶钟音. 2002. 现代农药应用技术全书[M]. 北京: 中国农业出版社: 114-115.

郑天凌, 陈瑛, 李福东, 等. 1994. 控制对虾弧菌病药物的试验研究[J]. 水产学报, 18(3): 215-219.

Fukui H, Fujihara Y, Kano T. 1987. In vitro and in vivo antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens [J]. Fish Pathology, 22: 201-207.

Gaikowski M P, Wolf J C, Endris R G, et al. 2003. Safety of aquaflor (Florfenicol, 50% Type A Medicated Article), administered in feed to channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Toxicologic Pathology, 31: 689-697.

Grant A N, Laidler L A. 1993. Assessment of the antimicrobial sensitivity of *Aeromonas salmonicida* isolates from farmed Atlantic salmon in Scotland [J]. Veterinary Record, 133: 389-391.

Inglis V, Richards R H. 1991. The in vitro susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents [J]. Journal of Fish Diseases, 14: 641-650.

Samuelsen O B, Bergh Oe, Ervik A. 2003. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 52(24): 127-133.

Williams R R, Bell T A, Lightner D V. 1992. Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with *Penaeid shrimp* larvae [J]. J Aquat Anim Health, 4: 262-270.

(责任编辑 万月华)

Experimental Study on Inhibiting Bacteria in Vitro and Acute Toxicity of Florfenicol to *Pseudosciaena crocea*

LI Si-yuan¹, XING Chen-guang¹, LI Kai², LV Yong-lin², WANG Guo-liang¹

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. Fisheries Technical Extension Station of Wenzhou, Wenzhou 325003, China)

Abstract: The checkerboard microdilution method was applied to study the effect of florfenicol on inhibiting bacteria in vitro isolated from diseased *Pseudosciaena crocea* with disk-diffusion method. It is studied that the effect of florfenicol combined with 3 Chinese herbal medicines and florfenicol with *Pseudosciaena crocea*. The results showed that MIC values of florfenicol against eight strains of vibrios were in the range 0.39 – 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the minimal bactericidal concentrations (MBC) was equal or doubled to minimal inhibitory concentrations (MIC). Compared with the single text, the MIC values of combination were slightly lower, and the fractional inhibitory concentration (FIC) index was between 1 and 0.75. The synergic action of *Rhus punjabensis* Steud and florfenicol were obviously observed; It was found that its LD_{50} (96 h) for *Pseudosciaena crocea* was higher than 1 000 mg/kg body weight, and the safe concentration of florfenicol was over 100 mg/kg body weight.

Key words: Florfenicol; *Pseudosciaena crocea*; Inhibiting bacteria in vitro; Acute toxicity