

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00230

防治鳗鲡细菌性疾病的中西药复方筛选

黄文树^{1,2,3}, 陈学豪^{1,2,3}, 梁英^{1,2,3}, 郭松林^{1,2,3}, 关瑞章^{1,2,3}

1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021;
2. 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;
3. 集美大学 水产生物技术研究, 福建 厦门 361021

摘要: 采用纸片扩散法测定了 18 种化学药物对 3 株鳗鲡致病菌(AA1、AA2 和 AA3)的抑菌效果, 结果显示, 该 3 株致病菌对多肽类药物和氨基糖苷类药物敏感; 采用液体稀释法分别测定 7 种化学药物和 3 种常用中草药对 3 株致病菌的最小抑菌浓度, 结果显示, 对于化学药物的抑菌效果, 2 种检测方法结果基本一致。进一步选择五倍子与其中 4 种化学药物联用研究, 筛选出价廉而抑菌效果好的中西药复方, 并评测该复方药物对细菌人工感染欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)的防治效果。结果显示, 五倍子(*Rhus chinensis*)与氟苯尼考联用可协同抑制该 3 株细菌的生长, 以该复方药物防治上述 3 株细菌人工感染鳗鲡时, 被感染鳗鲡存活率可提高 20%~50%。[中国水产科学, 2011, 18(1): 230–236]

关键词: 欧洲鳗鲡; 致病菌; 五倍子; 氟苯尼考

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0230-07

鳗(*Anguilla* spp.)俗称鳗鲡, 是中国重要的出口创汇农产品之一, 其中欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)是最主要的养殖种类之一。近年, 随着中国鳗鲡养殖集约化程度的提高, 鳗鲡病害日趋严重, 尤其是细菌性疾病, 每年给中国的鳗鲡养殖业造成数以亿元计的经济损失, 严重制约了该产业的健康可持续性发展。

目前, 对于鳗鲡细菌性疾病的防治, 多数养殖从业者长期采用单一抗菌化学药物, 其结果易导致细菌耐药性增强, 鳗体内药物残留量增加, 对人类食品安全与公共卫生安全造成威胁。在中国, 中草药研究已有数千年历史, 具有丰富的资源, 而且中草药具天然性、营养性、双向调节、低毒副、低残留、不易产生抗药性等优点。但是, 与化学药物相比, 中草药往往存在药性温和、药效反应时间较长, 抑(杀)菌效果不理想等缺点, 因此, 通过中、西

药的合理配伍, 以达到缩短疗程、减轻药物不良反应、减少耐药菌株的产生、扩大药物适应症范围和促进水产养殖动物体质恢复的目的, 对防治水产动物疾病有重要意义。

鳗鲡致病菌对中草药和化学药物的敏感试验已有报道^[1], 其研究结果显示, 中草药和化学药物的合理联用可有效地提高其抑(杀)菌作用。但是, 未见较完整地进行中西药复方筛选及评测其疗效的研究报道。本研究针对福建省常见的鳗鲡致病菌筛选中西药复方, 并通过细菌人工感染模型验证复方药物的疗效, 以期对鳗鲡养殖生产实践指导服务, 并为渔用中西药复方的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 致病菌 实验用 3 株鳗鲡致病菌(AA1、

收稿日期: 2009-10-12; 修订日期: 2009-12-07.

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-043); 福建省科技计划项目(2007F5079, 2009N2003-1); 集美大学科研基金项目(ZQ2006024).

作者简介: 黄文树(1973-), 男, 博士, 副教授, 从事水产病害与防治教学与科研工作. E-mail: wshuang@jmu.edu.cn

通讯作者: 关瑞章(1953-), 男, 教授, 博导, 从事渔业水体生态与病害研究. E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

AA2、AA3)于 2001–2007 年从福建省部分养殖场的罹病养殖欧洲鳗鲡肝脏中分离获得,并经过人工回归感染证明是欧洲鳗鲡致病菌。菌株 AA1 鉴定为 *Aeromonas hydrophila*, 菌株 AA2 鉴定为 *Aeromonas sobria*, 菌株 AA3 鉴定为革兰氏阳性杆状细菌,未鉴定到种。保存于国家农业行业科研专项 Nyhyzx07-043 的菌种库。

1.1.2 实验用鳗鲡和饲料 购自福建省莆田市某养鳗场,体质量(39.7 ± 4.8)g。采用曝气超过 24 h 的自来水养殖(饲养),水温 $22 \sim 28^{\circ}\text{C}$,投喂海马牌成鳗配合饲料,每日 2 次,每日投喂总量控制在鳗鱼体质量的 1%左右。

1.2 方法

1.2.1 药物的初筛 采用纸片扩散法,参照杭州天和微生物有限公司操作手册进行,培养基采用 Mueller-Hinton Agar(简称 MHA)和 Mueller-Hinton Broth(简称 MHB),购自广东省科学院微生物研究所环凯微生物科技公司。即称取 27 g MHB 加水 1 000 mL 溶解, 121°C 灭菌 15 min,冷却后备用。均匀涂布试验菌液(1.0×10^9 CFU/mL)于 MHA 平板上,将药敏纸片平贴于平板上(4 片/平板), 28°C 培养 24 h,用精度 1 mm 尺子测量抑菌环的直径,并记录结果。

1.2.2 药物的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)测定 化学药物原液配制参照 Alderman 等^[2]。配制好的药物分装于 1.5 mL 灭菌离心管中, -20°C 保存备用。

中草药的制备: 称取 10 g 所选药物,加入自来水 100 mL 浸泡 0.5 h,煎煮 0.5 h,不时进行搅拌,药液用 8 层纱布过滤,滤渣再次煎煮、过滤,合并药液后,水浴浓缩至 50 mL,药液浓度即为 0.2 g/mL。 112°C 灭菌 15 min 后, 4°C 保存备用。

药物稀释: 在 96 孔(8 行 $\times$ 12 列)微量细胞培养板(Falcon 公司)第 1 列中每孔加 200 μL 药液,其余各孔分别加 100 μL MHB 培养基,然后每行从第 2 孔开始,进行 2 倍稀释,至第 11 孔。第 12 孔不加药物作为对照,使用 4 块微量细胞培养板重复试验。

细菌接种: 除第 1 列补加 100 μL MHB 作为对

照外,每孔接种 100 μL 活化的细菌培养物(用 MHB 调菌浓度为 1.0×10^7 CFU/mL),振荡混合均匀, 28°C 培养 24~28 h (通常为 24 h)判定抑菌结果。

结果判定: 参照 Alderman 等^[2]的方法,即在黑色背景下,首先观察不加药物的对照孔和不加细菌的对照孔的情况;然后观察不同药物浓度的微孔中细菌的生长情况。若样品孔中液体呈浑浊,表明有细菌生长,该药物浓度不足以抑菌;如果样品孔中液体澄清透明(与不加菌液的对照孔相近),判定该药物浓度能抑制细菌生长。以能抑制细菌生长的最低药物浓度判定为该药物最小抑菌浓度即为 MIC。

1.2.3 药物联用的抑菌试验 采用棋盘交叉法,以药物对细菌的最小抑菌浓度(MIC)的 2 倍浓度开始进行 2 倍梯度稀释。2 种药物的稀释分别在微量细胞培养板的列和行进行,一种药物是沿行稀释,在同一列上各孔的药物浓度相同;另一种药物沿列稀释,同一行中各孔的药物浓度相同。这样在每孔中可得到不同浓度组合的 2 种药物混合液。每块细胞培养板均设有不加菌液的对照和不加药物的对照。除不加菌液的对照孔外,每孔中加入 100 μL 活化的细菌培养物(用 MHB 校正到 1×10^7 左右),振荡混合均匀, 28°C 培养 24~28 h (通常为 24 h)。每个样品进行 4 次重复。

计算部分抑菌浓度(Fractional Inhibitory Concentration, FIC)指数^[1]

$$\text{FIC} = \frac{\text{A 药联合时的 MIC}}{\text{A 药单测时 MIC}} + \frac{\text{B 药联合时的 MIC}}{\text{B 药单测时 MIC}}$$

结果判定: FIC < 0.5 为协同作用; FIC 为 0.5~1 为累加作用; FIC 为 1~2 为无关作用; FIC > 2 为拮抗作用。具有协同或累加作用的配伍为有效配伍,具有无关或拮抗作用的配伍为禁忌配伍。

1.3 复方药物的疗效实验

1.3.1 鳗鲡分组及实验设计 暂养鳗鲡待摄食正常(约 2 周)后,选取规格相近的鳗鲡进行分组试验。每株致病菌都设有人工感染不给药组和给药组,每组设 2 个平行,每组放养鳗鲡 10 尾,水族箱规格为 100 cm $\times$ 60 cm $\times$ 80 cm,即每株致病菌共用鳗鲡 40 尾。另外,设有 2 个注射生理盐水为空

白对照组。

1.3.2 人工感染及药物治疗试验 鳗鲡人工感染采用背部肌肉注射法, 剂量 0.1 mL, 细菌浓度为 1.0×10^8 个/mL。人工感染后第 3 天开始药物治疗, 给药的方式采用拌料喂养, 药物剂量根据药敏试验结果, 连续给药 7 d。每天早 6:30 和晚 18:00 各投喂 1 次, 喂后 2.5 h 换水, 每次换水量为约 30%。

2 结果与分析

2.1 抑制鳗鲡致病菌中西药复方的筛选

2.1.1 3 株致病菌的药物敏感性检测 采用纸片扩散法测试了氨基糖苷(妥布霉素、庆大霉素、丁氨卡那霉素和卡那霉素等 4 种)、 β -内酰胺(氧哌嗪青霉素、青霉素 G、苯唑青霉素、头孢拉定、头孢哌酮、先锋 V、先锋噻肟、头孢氨噻三嗪、头孢呋肟和复达欣等 10 种)、多肽(万古霉素)、磺胺(复方新诺明)、喹诺酮(氟哌酸)和四环素类(四环素)6 大类, 共计 18 种药物对 3 株致病菌的抑菌作

用效果。参照常用抗生素药物敏感性试验判断标准分析, 结果显示, 3 株致病菌对多肽类(万古霉素)、绝大多数的氨基糖苷类药物(丁胺卡那和庆大霉素)和部分 β -内酰胺类(头孢拉定和先锋必)3 类 5 种药物敏感, 对多数的 β -内酰胺类(苯唑青霉素、头孢氨噻三嗪、头孢呋肟和复达欣)、喹诺酮类(氟哌酸)和磺胺类(复方新诺明)3 类 6 种药物耐药, 对其余 7 种药物的敏感性相差较大(表 1)。3 株细菌(AA1、AA2 和 AA3)对所测试的 18 种药物敏感率分别为 44.4%(8/18)、55.6%(10/18)和 44.4%(8/18)。

2.1.2 药物单用对 3 株致病菌的抑菌效果 根据上述试验结果, 结合水产养殖中的用药成本等情况, 选择氨基糖苷类(庆大霉素和丁胺卡那)、 β -内酰胺类(先锋 V 和先锋噻肟)、四环素类(四环素)5 种药物, 并增设了土霉素、氯霉素类(氟苯尼考)以及五倍子(*Rhus chinensis*)、大黄(*Elsholtzia pen-*

表 1 纸片法测定 3 株鳗鲡病原菌对 18 种化学药物的抑菌圈直径
Tab. 1 Inhibition zone diameters of 18 antimicrobial agents against three pathogenic bacteria from eel

药品 antimicrobial agent	致病菌 pathogenic bacterium		
	AA1	AA2	AA3
多肽类 peptide			
万古霉素 vancomycin	22.5 ± 2.4	24.0 ± 0.0	19.5 ± 0.7
氨基糖苷类 aminoglycoside			
丁胺卡那 amikacin	32.0 ± 1.6	30.5 ± 0.7	25.5 ± 0.7
庆大霉素 gentamycin	25.5 ± 0.7	28.0 ± 1.4	22.0 ± 0.7
妥布霉素 tobramycin	17.5 ± 1.0	26.0 ± 1.4	19.5 ± 0.7
卡那霉素 kanamycin	—	30.0 ± 2.8	24.0 ± 0.0
β -内酰胺类 β -lactams			
头孢拉定 cefradine	34.5 ± 0.7	34.0 ± 2.8	34.0 ± 1.4
头孢哌酮(先锋必) cefoperazone	30.5 ± 1.3	33.0 ± 0.7	25.0 ± 0.7
先锋 V(头孢唑啉) cefazolin	24.5 ± 0.6	30.5 ± 2.1	18.5 ± 3.5
氧哌嗪青霉素 piperacillin	33.0 ± 1.0	31.5 ± 0.7	26.5 ± 0.7
青霉素 G penicillin G	28.5 ± 0.7	30.5 ± 0.7	—
先锋噻肟 cefotaxime	27.5 ± 2.1	28.8 ± 2.2	7.0 ± 1.4
头孢氨噻三嗪 ceftriaxone	26.5 ± 1.8	31.5 ± 0.7	15.0 ± 1.4
苯唑青霉素 oxacillin	—	—	—
头孢呋肟 cefuroxime	—	—	—
复达欣 ceftazidime	—	—	—
四环素类 tetracycline			
四环素 tetracycline	—	31.5 ± 0.7	20.5 ± 0.7
喹诺酮类 quinolone			
氟哌酸 norfloxacin	—	—	17.5 ± 0.7
磺胺类 sulfonamide			
复方新诺明 cotrimoxazole	—	—	—

注: “—”表示无明显抑菌圈, 下划线表示为中等抑菌, 斜体数据表示敏感, 其余为耐药。
Note: “—” indicates no significant inhibition zone. Underlined data indicate intermediate. Italic data indicate susceptible. Other data indicate resistant.

duliflora W. W. Smith)和黄连(*Coptis chinensis*)3种常用的中草药,采用微量液体培养法分别测定其对 3 株致病菌的最小抑菌浓度(MIC),参照 NCCLS 标准判定敏感性结果。结果显示,3 株致病菌对庆大霉素、丁胺卡那、头孢拉定、先锋 V(头孢唑啉)和先锋噻肟 5 种化学药物都敏感,该结果与纸片扩散法的结果基本吻合,仅 AA2 和 AA 在进行四环素药敏试验时,纸片法判定为敏感,用微孔板扩散却判定为耐受。3 种中草药的抑菌效果差异显著,五倍子对 AA1、AA2 和 AA3 的 MIC 分别为 250μg/mL、31.3μg/mL 和 31.3 μg/mL。大黄和黄连对该 3 株菌的 MIC 均大于 1 000 μg/mL(表 2)。因此,选取五倍子分别与 4 种化学药物,庆大霉素、丁胺卡、那先锋噻肟和氟苯尼考(水产养殖中常用药物)联用,以筛选合适复方。

2.1.3 抗 3 株致病菌的中西药复方筛选 分别以中、西药单用时的 2×MIC 为起始药物浓度,以 2 倍梯度稀释法配制药剂,并应用棋盘交叉法筛选中西药联用复方,根据 FIC 指数评判联用效果。结果显示,五倍子和氟苯尼考联用可协同抑制 3 株致病菌(AA1、AA2 和 AA3)的生长,其 FIC 分别为 0.1、0.3 和 0.3。五倍子+先锋噻肟、五倍子

+丁胺卡那以及五倍子+庆大霉素联用对 AA1 菌的生长抑制分别呈协同作用、相加作用和拮抗作用,其 FIC 分别为 0.3、0.6 和 2.5;而该 3 种组合对于 AA2 菌和 AA3 菌的生长抑制均呈拮抗作用,其 FIC 均为 4.0(表 3)。

2.2 复方药物对鳊鲴细菌性疾病的治疗效果

AA1 菌人工感染后第 3 天,不给药组的多数欧洲鳊鲴胸鳍和尾鳍有明显的充血现象,注射部位有轻微腐烂,鳊鲴的平均存活率 80%;复方药物治疗组的平均存活率 100%。

AA2 菌人工感染后第 3 天,不给药组的多数欧洲鳊鲴除胸鳍和尾鳍略充血外,腹部有大面积充血,轻压腹部,肛门流出黄色黏液,注射部位腐烂,创口边缘略带血丝,不给药组平均存活率为 45%;给药组的平均存活率 95%。

AA3 菌人工感染后第 3 天,不给药组的多数欧洲鳊鲴的胸鳍、腹鳍和尾鳍略充血,注射部位腐烂,其平均存活率 60%;给药组的平均存活率 100%。

注射生理盐水对照组的鳊鲴,外观无明显症状,存活率为 100%(表 4)。

表 2 化学药物单用对 3 株鳊鲴病原菌的最小抑菌浓度

Tab. 2 MICs of seven antimicrobial agents and three traditional Chinese medicines against three pathogenic bacteria from ell μg·mL⁻¹

药品 antimicrobial agent	致病菌 pathogenic bacterium		
	AA1	AA2	AA3
氨基糖苷类 Aminoglycosides			
庆大霉素 Gentamycin	4.0	4.0	4.0
丁胺卡那 Amikacin	12.5	12.5	12.5
β-内酰胺类 β-lactams			
先锋 V(头孢唑啉) Cefazolin	19.5	19.5	19.5
先锋噻肟 Cefotaxime	0.4	12.5	<u>25.0</u>
四环素类 Tetracyclines			
土霉素 Terramycin	39.1	19.5	19.5
四环素 Tetracycline	39.1	39.1	19.5
氯霉素类 Chloramphenicol			
氟苯尼考 Florfenicol	19.5	19.5	39.0
中草药 Tradition Chinese Herbs			
五倍子 Gallnut	250.0	31.3	31.3
大黄 Rhubarb	2500.0	1250.0	2500.0
黄连 Goldthread	2250.0	2250.0	2250.0

注:下划线表示为中等抑菌,斜体数据表示敏感,其余为耐药。
Note: Underlined data indicate intermediate. Italic data indicate susceptible. Other data indicate resistant.

表 3 五倍子分别与 4 种化学药物联用对该 3 株鳃鲈病原菌的抑菌效果

Tab. 3 MICs and FICs of gallnut *Rhus chinensis* M. combined with four antimicrobial agents against three pathogenic bacteria from eel

菌株 strain	药物组合 combination	最小抑菌浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) MIC		部分抑菌浓度 指数 FIC	联用效果 result
		五倍子 gallnut (联用前/后) (pre-/post combination)	化学药物 antimicrobial agent (联用前/后)(pre-/post combination)		
AA1	五倍子+氟苯尼考 Gallnut +Florfenicol	250.0/15.6	19.5/1.2	0.1	协同作用 synergism
	五倍子+先锋噻肟 Gallnut +Cefotaxime	250.0/31.3	0.4/0.1	0.3	协同作用 synergism
	五倍子+丁胺卡那 Gallnut +Amikacin	250.0/31.3	12.5/6.3	0.6	相加作用 addition
	五倍子+庆大霉素 Gallnut +Gentamycin	250.0/250.0	4.0/6.0	2.5	拮抗作用 antagonism
	五倍子+氟苯尼考 Gallnut +Florfenicol	31.3/4.0	19.5/2.4	0.3	协同作用 synergism
	五倍子+先锋噻肟 Gallnut +Cefotaxime	31.3/ 62.5	12.5/25.0	4.0	拮抗作用 antagonism
AA2	五倍子+丁胺卡那 Gallnut +Amikacin	31.3/ 62.5	12.5/ 25.0	4.0	拮抗作用 antagonism
	五倍子+庆大霉素 Gallnut +Gentamycin	31.3/ 62.5	4.0/ 8.0	4.0	拮抗作用 antagonism
	五倍子+氟苯尼考 Gallnut +Florfenicol	31.3/4.0	39.0/4.9	0.3	协同作用 synergism
	五倍子+庆大霉素 Gallnut +Gentamycin	31.3/62.5	4.0/8.0	4.0	拮抗作用 antagonism
	五倍子+先锋噻肟 Gallnut +Cefotaxime	31.3/62.5	25.0/50.0	4.0	拮抗作用 antagonism
	五倍子+丁胺卡那 Gallnut +Amikacin	31.3/62.5	12.5/25.0	4.0	拮抗作用 antagonism

表 4 五倍子与氟苯尼考的复方药物防治鳃鲈人工细菌感染的治疗效果

Tab. 4 Curative effects of compounds of gallnut *Rhus chinensis* M. combined with florfenicol on treating eel challenged by one of three pathogenic bacteria from eel

菌株 strain	组别 group	尾数 <i>n</i>	平均体质量/g average body weight	药物剂量/($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot 10^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$) Dosage		死亡数 cumulate death no.	平均存活率/% average survival rate
				五倍子 gallnut	氟苯尼考 florfenicol		
AA1	不给药 un-medicated	10	39.6 $\pm$ 4.7	0	0	2	80
		10	40.1 $\pm$ 4.7	0	0	2	
	给药 medicated	10	39.9 $\pm$ 4.8	6.2	0.5	0	100
		10	39.4 $\pm$ 3.8	6.2	0.5	0	
AA2	不给药 un-medicated	10	40.3 $\pm$ 4.8	0	0	5	45
		10	41.2 $\pm$ 5.5	0	0	6	
	给药 medicated	10	40.3 $\pm$ 5.4	1.6	0.9	1	95
		10	38.7 $\pm$ 5.5	1.6	0.9	0	
AA3	不给药 un-medicated	10	40.9 $\pm$ 4.7	0	0	4	60
		10	39.7 $\pm$ 5.6	0	0	4	
	给药 medicated	10	39.1 $\pm$ 5.7	1.6	2.0	0	100
		10	40.0 $\pm$ 4.6	1.6	2.0	0	
	生理盐水对照 saline	10	42.7 $\pm$ 5.3	0	0	0	100
		10	43.6 $\pm$ 6.2	0	0	0	

3 讨论

3.1 复方药物治疗鳃鲈细菌性疾病的机理

氟苯尼考和五倍子抗菌作用机理不同，二者

联用可能产生协同抑菌作用。氟苯尼考的抗菌作用机理是通过结合细菌核蛋白体，抑制肽酰基转移酶活性，从而妨碍肽链延伸，干扰细菌蛋白质合成^[3]。五倍子的主要有效成分是多元酚类化合

物——鞣酸,可凝固微生物体内的原生质和抑制其代谢所需的酶类,达到抗细菌和抗病毒的作用^[4]。本研究的体外抑菌试验结果证明,二者联用可协同抑制三株鳊鲢致病菌的生长。根据余培建等^[5]对氟苯尼考在欧洲鳊鲢体内药物代谢动力学的研究结果发现,口灌法给药在鳊鲢体内不同组织器官的药物峰值浓度不同,最高药物峰值不足起始药物浓度的 80%,且给药 24 h 后体内药物残留低于 10%。根据 Shojae 等^[6]的关于用抗菌药物的最佳给药方案建议,在整个治疗期间,对于抑菌类抗菌药物应保证在感染部位的药物浓度高于 MIC₉₀(抑制 90% 受试菌所需的 MIC)。本研究进行活体复方药物治疗鳊鲢疾病时,药物剂量明显偏低,但该复方药物却能提高鳊鲢的存活率达 20%~50%。该复方药物是否通过调动机体其他免疫机制达到抗病目的,还有待进一步研究。

氟苯尼考和五倍子在一定的浓度下均可调动鱼体免疫功能。氟苯尼考可双向调节鱼类免疫功能,即低浓度时提高鱼类免疫功能,高浓度时抑制鱼类免疫功能。张丽敏等^[7]报道以剂量为 5~20 mg/kg(体质量)的氟苯尼考腹腔注射红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*),结果显示,低浓度(5 mg/kg 和 10 mg/kg)时,鱼血清中免疫相关的酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶和碱性磷酸酶等活性增强,在一定程度上提高了鱼体免疫抗感染能力^[7]。Sieroslawska 等^[8]报道高浓度氟苯尼考(40 µg/mL)可抑制鲤(*Cyprinus carpio*)头肾和脾脏离体 B 细胞和 T 细胞的增殖,并降低多形核嗜中性粒细胞和单核细胞对细菌的吞噬作用,但在较低浓度时(20 µg/mL),其对免疫因子无明显影响。五倍子也可以提高水产养殖动物的免疫能力和修复作用。姜蕾等^[9]报道以饵料质量 1% 的五倍子药饵饲喂鲤,发现其肝脏的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性显著提高,说明五倍子可增强鱼体的非特异性免疫功能;此外,在一定时间内可以降低细菌人工感染后罹病鲤的血浆中尿酸、尿素氮和肌酐等含量,说明五倍子还能较好地帮助修复病鱼的受损肾脏和肌肉组织。本研究所筛选的复方药物能否提高机体的免疫能力有待进一步研究。

3.2 氟苯尼考的耐药性

氟苯尼考是一种化学合成的新型广谱抗菌药。目前,已在全球数十个国家和地区上市并广泛使用,可治疗多种水产动物的细菌性疾病。关于其耐药性已有报道, Schmidt 等^[10]研究了丹麦 4 个淡水鱼养殖场中鱼体、水体和底质等样品中细菌对氧苯尼考的敏感性,结果发现,平均 9.5% 的细菌对氟苯尼考不敏感;对于从水体分离的 313 株气单胞菌(*Aeromonas*)的药敏结果分析,发现仅 1 株细菌对氟苯尼考耐受,其 MIC 高达 32 µg/mL,其他敏感菌株的 MIC 为 0.125~1.0 µg/mL。在中国,氟苯尼考于 1999 年被批准上市,目前已发现有些细菌对其产生耐药性。本小组前期研究发现,24 株养殖鳊鲢常见致病菌中有 30% 以上对氟苯尼考不敏感^[1],本研究所用的 3 株致病菌对氟苯尼考均不敏感,其 MIC 达到 19.5 µg/mL 和 39.0 µg/mL。Li 等^[11]试验分析了采集的 70 株鸡杆菌病的致病菌——大肠杆菌(*Escherichia coli*)对氟苯尼考等药物的敏感性时,发现已有 29% 的致病菌对氟苯尼考耐受,其 MIC 超过 32 µg/mL。因此,在治疗鳊鲢细菌性疾病时,应根据不同致病菌株对药物的敏感性试验结果合理选择不同药物,不可仅根据是哪类致病菌而选择药物。

参考文献:

- [1] 吴亮,关瑞章,黄文树. 氟苯尼考与 4 种中药联用对鳊鲢致病菌的抑制作用[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2008, 13(1): 7-11.
- [2] Alderman J, Smith P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases [J]. Aquaculture, 2001, 196: 211-243.
- [3] 徐力文,廖昌容,刘广锋. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 512-518.
- [4] 彭建平,张杰,罗鹏程,等. 五倍子鞣酸的体外杀精和抑菌作用研究[J]. 中国药房, 2007, 18(30): 2337-2339.
- [5] 余培建,翁祖桐,樊海平,等. 氟苯尼考在欧洲鳊鲢体内的药物代谢动力学的研究[J]. 福建水产, 2005, 4: 52-57.
- [6] Shojae A F, Lees P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization [J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 14, 307-313.
- [7] 张丽敏,吴灶和,简纪常,等. 注射氟苯尼考对红笛鲷免

- 疫指标的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 50–54.
- [8] Sieroslawska A, Studnicka M, Bownik A, et al. Antibiotics and cell-mediated immunity in fishin vitro study [J]. Acta Vet, 1998, 67 (4): 329–334.
- [9] 姜蕾, 郑曙明. 五倍子对鲤鱼细菌性败血症的药效试验初报[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 460–464.
- [10] Schmidt A S, Bruun M S, Dalsgaard I, et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms [J]. Appl Environ Microb, 2000, 66(11): 4908–4915.
- [11] Li X S, Wang G Q, Du X D, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among Escherichia coli isolates from diseased chickens [J]. J Vet Sci, 2007, 8(3): 243–247.

Screening compounds of Chinese herbal medicine and antimicrobial agent for controlling bacterial diseases of eels

HUANG Wenshu^{1,2,3}, CHEN Xuehao^{1,2,3}, LIANG Ying^{1,2,3}, GUO Songlin^{1,2,3}, GUAN Ruizhang^{1,2,3}

1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety (Jimei University), Xiamen 361021, China;

3. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: To screen effective compounds of Chinese herbal medicine and antimicrobial agents for controlling bacterial diseases of European eels (*Anguilla anguilla*), bacteriostatic activities of eighteen antimicrobial agents against three pathogenic bacteria (AA1, AA 2 and AA3) from eels were estimated using the method of disc diffusion. The results showed that all of the bacteria were sensitive to antimicrobial peptides and aminoglycosides. Then the minimum inhibitory concentrations (MICs) of seven antimicrobial agents and three Chinese herbal medicines against the three bacteria were estimated and further the MICs of *Rhus chinensis* M. combined with one of the four antimicrobial agents were also investigated. The results showed that combination of florfenicol and *Rhus Chinensis* M. could inhibit the growth of the three bacteria. Furthermore, the compound was used in curing eels artificially challenged by the three pathogenic bacteria. The results showed that the cumulative survival rates of eels administrated was 20%–50% higher than those of eels non-administrated. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 230–236]

Key words: *Anguilla anguilla*; bacteria pathogens; *Rhus Chinensis* M.; florfenicol

Corresponding author: GUAN Ruizhang. E-mail: rzguan@jmu.edu.cn