

文章编号:1000-0615(2000)06-0544-05

半咸水、海水对几种渔用抗菌药物体外活性的影响

李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:研究了人工海水、天然半咸水以及生理盐水对 6 种我国常用抗菌药物(环丙沙星、四环素、土霉素、氯霉素、磺胺以及呋喃唑酮)体外抗两种鱼类病原细菌(*Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio fluvialis*)活性的影响。结果表明:海水对几乎所有受试药物的抗菌活性均呈抑制作用,其中对土霉素的影响最为显著;半咸水可使土霉素、四环素及磺胺药的抗菌活性下降;生理盐水对不同药物或不同细菌的作用不一致;呋喃唑酮的抗菌活性不受 3 种水质的影响。此外,喹诺酮与二价阳离子的整合产物可能并不稳定,当用无二价阳离子水稀释后药物可被重新释放。

关键词:鱼类;抗菌药物;海水;半咸水

中图分类号:S948 **文献标识码:**A

Effects of brackish water and seawater on *in vitro* efficacy of antibacterial drugs used in aquaculture

LI Ai-hua, CAI Tao-zhen, WU Yu-shen

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China*)

Abstract: The effect of artificial seawater, brackish water and 0.85% NaCl solution on *in vitro* antibacterial efficacy of 6 most common antimicrobials in China, including Ciprofloxacin (CIP), tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chloramphenicol (CP), sulfamethoxazole (SA) and furazolidone (NF), against two bacteria from fish, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* were investigated. The results indicated that the *in vitro* activity of almost all of the drugs tested, particularly OTC, was significantly influenced by seawater. A similar negative effect was observed on OTC, TC and SA by brackish water; The effect on the antibacterial efficacy by physiological saline varied with drugs or bacteria. No change in efficacy of NF against the two pathogens was demonstrated with 3 different assay media in this study. In addition, the complex of quinolone and bivalent cation in seawater or brackish water was speculated not stable, quinolone can be released into media when diluted with water without bivalent cation.

Key words: fish; antibacterial drugs; seawater; brackish water

随着我国海水养殖业以及盐碱水域养殖业的蓬勃发展,鱼类病害问题也已相当严重,而且抗菌药物的使用与淡水养殖中同样普遍。目前在我国使用的渔用抗菌药物中,不仅有氟哌酸(norfloxacin)、氟啶酸(依诺沙星, enoxacin)、环丙氟哌酸(环丙沙星, ciprofloxacin)等新一代的喹诺酮类药物,而且氯霉素、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。国外也在使

收稿日期:2000-06-19

资助项目:国家“九五”科技攻关资助项目(96-008-04-01)

作者简介:李爱华(1963-),男,江西南昌人,副研究员,主要从事鱼类细菌学和药理学研究。Tel:027-87647721, E-mail: liaihua@

或试用 oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin 等多个品种^[1]。

海水的理化特点与淡水存在巨大的差别,如果直接采用淡水养殖的用法、用量,对于许多药物来说可能不合理。而在医学上也早已明确,喹诺酮类药物受二价阳离子的影响明显^[2-5];四环素类药物也同样受二价阳离子的显著影响^[6,7]。目前,有关海水、半咸水对抗菌药物药效的影响我们所知甚少,只有少量的相关研究报道^[7,8],这给抗菌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非常必要。本研究的目的是要以我国常用的渔用抗菌药物为对象,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:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) XS91-4-1 和河弧菌(*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^[9],采用 2×YT 培养基(0.5%NaCl)培养。

半咸水:取自山东省淄博市高青县,盐度为 2~3, pH 8.1~8.3, 0.45 μm 过滤除菌。

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%, 0.45 μm 过滤除菌, pH 6.8~7.0。

试验药物:环丙沙星、土霉素、四环素、氯霉素、呋喃唑酮、磺胺甲基异噁唑。

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为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的使用液, 0.45 μm 过滤除菌。在室温下放置 2h, 然后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 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,采用微量双倍稀释法(平底 96 孔板)^[9]测定它们对 2 种试验菌的最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。

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。可以看出,虽然以蒸馏水、生理盐水和海水所配制的药液在以蒸馏水作为介质时所测得抗嗜水气单胞菌的 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得的结果无明显变化,而且 3 种介质都有同样的表现。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河弧菌的 MIC 一致,均为 0.0061 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;以生理盐水作为介质,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嗜水气单胞菌有轻度影响,而对河弧菌则完全无影响。以海水作为介质,3 种配制方法所得结果也很接近。对嗜水气单胞菌和河弧菌的 MIC 分别为 0.0488~0.0976 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.0122~0.0244 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。方差分析表明,3 种溶剂间的 $P > 0.05$, 差异不显著。

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,通过与蒸馏水作为试验介质所得结果比较,从中可以发现:试验所采用的半咸水对环丙沙星无影响;生理盐水可使

环丙沙星对河弧菌的 MIC 升高 4 倍,而对嗜水气单胞菌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,对嗜水气单胞菌和河弧菌的 MIC 分别由 $0.0122\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.0061\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升为 $0.0976\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.0244\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别升高了 8 倍和 4 倍。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。氯霉素与环丙沙星基本相似,盐水和半咸水对氯霉素无影响,不过抗河弧菌的 MIC 下降了 1 倍;而以海水作 MIC 测定的介质时, MIC 值升高了 2~4 倍。盐度为 0.85% 的生理盐水对四环素的抑菌效果没有影响或有轻度增效作用;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 $3.125\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升为 $6.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。生理盐水对土霉素的作用与四环素相似;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,土霉素对两种试验菌的 MIC 由 $0.78\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.56\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均上升到 $6.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别升高了 8 倍和 4 倍;以海水作试验介质,土霉素的药效下降 32~16 倍,对嗜水气单胞菌和河弧菌的 MIC 上升为 $25.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,临床口服使用将失去治疗作用。生理盐水对磺胺甲基异噁唑抑制嗜水气单胞菌的作用有一定影响,但对河弧菌的 MIC 没有影响;半咸水和海水可使磺胺甲基异噁唑的药效下降 2~4 倍。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、半咸水和生理盐水对 6 种抗菌药物抑菌效果的影响

Tab.2 Effect of seawater, brackish water and physiological saline on antibacterial activity of 6 antibacterials drug against 2 fish bacteria

| 抗菌药物 | 最低抑菌浓度测定的介质 | 最低抑菌浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | | 抗菌药物 | 最低抑菌浓度测定的介质 | 最低抑菌浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | |
|------|-------------|--|--------|---------|-------------|--|--------|
| | | 嗜水气单胞菌 | 河弧菌 | | | 嗜水气单胞菌 | 河弧菌 |
| 环丙沙星 | 蒸馏水 | 0.0122 | 0.0061 | 氯霉素 | 蒸馏水 | 0.1953 | 0.3906 |
| | 生理盐水 | 0.0122 | 0.0244 | | 生理盐水 | 0.1953 | 0.1953 |
| | 半咸水 | 0.0122 | 0.0061 | | 半咸水 | 0.1953 | 0.3906 |
| | 海水 | 0.0976 | 0.0244 | | 海水 | 0.7813 | 0.7813 |
| 四环素 | 蒸馏水 | 3.125 | 3.125 | 土霉素 | 蒸馏水 | 0.780 | 1.560 |
| | 生理盐水 | 1.560 | 1.560 | | 生理盐水 | 0.780 | 0.780 |
| | 半咸水 | 6.250 | 6.250 | | 半咸水 | 6.250 | 6.250 |
| | 海水 | 6.250 | 6.250 | | 海水 | 25.00 | 25.00 |
| 呋喃唑酮 | 蒸馏水 | 0.078 | 3.125 | 磺胺甲基异噁唑 | 蒸馏水 | 78.125 | 78.125 |
| | 生理盐水 | 0.078 | 3.125 | | 生理盐水 | 156.25 | 78.125 |
| | 半咸水 | 0.039 | 3.125 | | 半咸水 | 312.5 | 312.50 |
| | 海水 | 0.078 | 3.125 | | 海水 | 312.50 | 156.25 |

表 1 配制药物的溶剂对环丙沙星抑菌效果的影响

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

| 最低抑菌浓度测定的介质 | 配制药物的溶剂 | 最低抑菌浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | |
|-------------|--------------|--|--------|
| | | 嗜水气单胞菌 | 河弧菌 |
| 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% 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 | 0.0244 | 0.0244 |
| 海水 | 盐度为 2.5% 的海水 | 0.0244 | 0.0244 |
| | 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 |

3 讨论

在医学上,有关二价阳离子对喹诺酮类药物的影响及其机理研究较多,然而,对于海水和半咸水对药物的影响因没有必要而从未见报道,但这一研究对于水产药物来说却具有重要意义。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,但呋喃唑酮例外。生理盐水对有些药物也有不同程度甚至不同性质的影响。Barnes 等^[10]也报道,3%的 NaCl 溶液可引起喹诺酮类药物的下降,但 Valisena 等^[5]和 Nanavaty 等^[6]结果显示,Na⁺、K⁺并没有显著影响。Blaser 和 Luthy^[2]以及 Smith 等^[3]的试验均表明,二价阳离子平均使喹诺酮的 MIC 升高 4 倍,这与本研究的结果相近。但半咸水和海水对磺胺甲氧嘧啶药效影响结果与其他学者报道的有差别^[7],他们在培养基中添加 50mM MgCl₂ 后试验发现,磺胺药的 MIC 没有变化。本研究的结果明确显示,水质对药物抗菌活性的影响不仅与药物性质有关,而且与细菌有关。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。

本试验的结果表明,试验溶剂对药效无显著影响,只要试验介质溶液相同,配制方法对药效无明显影响。同时,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。

喹诺酮类药物进入细菌细胞是通过简单扩散方式进行的,而流出细胞则通过一种需要消耗能量的主动转运方式进行^[4]。至于二价阳离子影响喹诺酮类药物的机理,一般认为主要是这类药物与 Mg²⁺ 或 Ca²⁺ 形成了螯合物,减少了药物在细胞内的积累以及 DNA 合成的抑制^[11,12],加入 EDTA 也不能改善这种情况。但这可能并不是由于这种螯合物太大以致不能通过细菌细胞外膜孔道蛋白通道 (porin channels) 的缘故。二价阳离子的出现导致喹诺酮抗菌活性的下降一方面可能是由于与外源离子,如与 Mg²⁺ 有关的 LPS 或脂磷壁质酸螯合的结果;另一方面,可能是对喹诺酮与其作用靶位 DNA 解旋酶之间的相互作用具有重大影响^[11]。如果 Mg²⁺ 出现在细菌与喹诺酮作用之后,则抗菌活性不受明显影响^[12]。本试验的结果提示,喹诺酮与二价阳离子的螯合物可能并不稳定,而是一种可逆反应。

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。对于敏感或高度敏感菌,这种影响对于临床疗效可能影响不大,但对于中度敏感菌则必需加大剂量。此外,在进行药物敏感性试验时应注意使用何种试验介质。在常规实验中,生理盐水和蒸馏水是两种最常用的试验介质。然而,从本试验的结果可知,对于有些药物,这两种介质会产生不同的结果。

当然,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,直接使用海水其浓度会对细菌生长产生严重影响,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] Martinsen B, Horsberg T E. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 °C [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39: 1059 - 1064.
- [2] Blaser J, Luthy R. Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on in-vitro activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Antimicrob Chemother, 1988, 22(1): 15 - 22.
- [3] Smith S M, Eng R H, Cherubin C E. Conditions affecting the results of susceptibility testing for the quinolone compounds [J]. Chemotherapy, 1988, 34(4): 308 - 314.
- [4] Kotera Y, Watanabe M, Yoshida S, et al. Factors influencing the uptake of norfloxacin by *Escherichia coli* [J]. J Antimicrob Chemother, 1991, 27(6): 733 - 739.
- [5] Valisena S, Palumbo M, Parolin C, et al. Relevance of ionic effects on norfloxacin uptake by *Escherichia coli* [J]. Biochem Pharmacol, 1990, 40(3): 431 - 436.
- [6] Nanavaty J, Mortensen J E, Shryock T R. The effects of environmental conditions on the in vitro activity of selected antimicrobial agents against

Escherichia coli[J]. *Curr Microbiol*, 1998,36(4): 212 – 215.

- [7] Lunestad B T, Goksoyr J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in seawater by complex formation with magnesium and calcium [J]. *Dis Aquat Org*, 1990, 9: 67 – 72.
- [8] Barnes A C, Hastings T S. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations[J]. *J Fish Dis*, 1995,18: 463 – 465.
- [9] 徐伯亥, 殷 战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J]. *水生生物学报*, 1993,17:259 – 266.
- [10] Gerhardt P, Murray R G E, Costilow R N, et al. *Manual of Methods for General bacteriology*[M]. American Society for Microbiology, Washington, 1981.
- [11] Barnes A C, Lewin C S, Hastings T S, et al . In vitro activities of 4 – quinolones against the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* [J]. *Antimicrobiol Agents Chemother*, 1990,34(9): 1819 – 1820.
- [12] Marshall A J, Piddock L J . Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1994,34(4): 465 – 483.