

# 单过硫酸氢钾粉对5种水产常见致病菌 的体内外抑菌作用

曾晓丹 曹阳\* 张盈娇 夏陈 陈建 宋艳

(四川省农业科学院水产用兽药临床药效及残留试验中心 四川省农业科学院农产品加工研究所,成都 610066)

**摘要** 研究了单过硫酸氢钾粉对5种水产常见致病菌的体内、外抑菌作用,测定了体外最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)及以保护率为指标的体内抑菌效果。结果表明,体外抑菌实验中,单过硫酸氢钾粉对爱德华氏菌 *Edwardsiella*、温和气单胞菌 *Aeromonas sobria*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tard*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 均有明显的抑制作用,其对5种菌的MIC分别为1、0.25、0.125、0.25、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;MBC与MIC相同。而体内抑菌实验中,随着单过硫酸氢钾粉浓度的增加,由5种致病菌引起鲫鱼的死亡率逐步降低。统计分析发现,使用0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  单过硫酸氢钾粉药浴鲫鱼,即可对由5种致病菌引起的鲫鱼病害有治疗的作用。

**关键词** 单过硫酸氢钾;水产致病菌;抑菌作用

中图分类号 S948 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0104-06

## Bacteriostasis *in vitro* and *in vivo* of potassium monopersulfate powder on five strains of common pathogenic bacteria in aquaculture

ZENG Xiao-dan CAO Yang\* ZHANG Ying-jiao  
XIA Chen CHEN Jian SONG Yan

(Aquaculture in the Veterinary Clinical Efficacy and Residual Test Center, Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066)

**ABSTRACT** The bacteriostatic activity of potassium monopersulfate powder on five strains of common pathogenic bacteria in aquaculture was studied, and the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) *in vitro* and protection rate *in vivo* were determined respectively. Results of *in vitro* bacteriostatic experiments showed that *Edwardsiella*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tard*, and *Pseudomonas fluorescens* were significantly inhibited by potassium monopersulfate powder. The MIC for these bacteria were 1, 0.25, 0.125, 0.25 and 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively, and the MBC were the same as the MIC. While for *in vivo* experiments, with the increase of concentration of potassium monopersulfate powder, mortality of *Carassius auratus* caused by the five pathogens decreased gradually. Statistical analysis showed that dipping *C. auratus* in 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  po-

四川省农业科学院农产品加工研究所青年基金资助

\* 通讯作者。E-mail: scjkzjl@163.com

收稿日期:2013-01-08;接受日期:2013-06-04

作者简介:曾晓丹(1981-),男,助理研究员,主要从事农产品深加工与相关药品研究。E-mail: zxd\_saas@aliyun.com, Tel: (028)84504755

tassium monopersulfate was effective in treating disease caused by the five pathogens in *C. auratus*.

**KEY WORDS** Potassium monopersulfate; Pathogenic bacteria in aquaculture; Bacteriostatic activity

单过硫酸氢钾粉为过硫酸氢钾复盐( $K_2SO_4 \cdot KHSO_4 \cdot 2KHSO_5$ )与絮凝剂组成的复合物,其主要抑菌及杀菌成分为过硫酸氢钾复盐。过硫酸氢钾复盐是过氧化氢与硫酸盐的加成物,其溶解于水中后产生各种高能量、高活性的小分子自由基、活性氧衍生物等过氧化氢的衍生物,能破坏微生物细胞膜的通透性屏障,使细胞内容物流失,丧失能量依赖性膜运输系统的功能,并且可与核酸中金属离子如钙、铁等结合,产生 $\cdot OH$ 基自由(张文福 1992),通过链式反应系统,破坏微生物细胞膜的通透性,干扰病原体的DNA和RNA合成(阳艳林等 2008),以达到杀灭细菌的目的。有报道指出,其代谢产物不会对人类和环境带来影响(Sharma 2002)。据此,单过硫酸氢钾凭借其高效、低毒与低残留的特点(张跃华等 2006),已开始作为食用菌的消毒剂。而作为一种新兴的兽用消毒剂,其兽医临床效果也已开始见诸于文献(颜新敏等 2005;陈小强等 2011;李继耀 2012)。为此,开展单过硫酸氢钾对水产常见致病菌的体内和体外抑菌效果研究,探讨其在水产消毒领域的适用性,为开发一种更为环保的渔用消毒剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品

供试药品:单过硫酸氢钾粉,含过硫酸氢钾24%、絮凝剂10%(兽用药品,四川金科药业有限责任公司)。

对照药品:三氯异氰尿酸粉,含三氯异氰尿酸30%(兽用药品,四川金科药业有限责任公司)。

#### 1.1.2 供试菌

试验菌株选择淡水养殖鱼类的常见致病菌,均由西南大学荣昌校区微生物教研室分离鉴定,包括爱德华氏菌、温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、荧光假单胞菌。

#### 1.1.3 培养基

所用药品除特殊标示外,均为成都科龙化工试剂厂生产的分析纯试剂。温和气单胞菌用自制培养基培养,将氯化钠5g、牛肉膏5g、蛋白胨10g溶于1000ml纯化水中,煮沸,使各成分充分溶解,冷却至常温后,用一定浓度的盐酸和氢氧化钠调整pH为7.6-7.8。其他致病菌均用市售普通肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司)培养。

以上液体培养基制备时,均以115℃灭菌30min,放于冰箱中4℃保存备用。

#### 1.1.4 实验动物

实验用鲫鱼来源于四川省农业科学院水产研究所联合养殖基地。选择体长9-12cm、健康无外伤的鲫鱼,曝气自来水暂养10d。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌液制备

将各种致病菌分别接种于相应的液体培养基中,置于28℃恒温培养箱中培养24h。取出后以麦氏比浊法确定菌液浓度,用液体培养基稀释菌液,获得终浓度为 $8 \times 10^6$  CFU/ml的体外抑菌实验应用菌液和 $1 \times 10^8$  CFU/ml的体内抑菌实验应用菌液。

### 1.2.2 体外抑菌实验

使用试管稀释法,药物按二倍比稀释,制成含单过硫酸氢钾粉浓度分别为2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03185、0.015625  $\mu g/ml$ 的8个药物实验组,每管药液为5ml,第9管作为细菌生长情况的对照,第10管作为无菌对照。每支试管加灭菌水至9ml。将1.2.1中制备好的体外抑菌实验应用菌液加入到第1-9管中,每管

加入量为1 ml,混合均匀,与补加了1 ml 灭菌水的第10管一同于28℃反应24 h。

药物与菌液接触24 h后,从每支试管中移取0.5–4.5 ml 反应液至无菌液体培养基中,再在28℃培养24 h后,肉眼观察,试管振荡后仍然澄清者判定为无菌生长,呈阴性,试管混浊的判定为有菌生长,呈阳性,最低无细菌生长试管所含药物的浓度为最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC);继续培养至48 h,肉眼观察,最低无细菌生长试管所含药物的浓度为最小杀菌浓度(Minimum bactericidal concentration, MBC)(汪开毓等2000)。实验设3个平行组。

### 1.2.3 体内抑菌实验

在鱼体腹部注射0.2 ml 浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/ml 的细菌进行人工感染,在出现明显感染菌相应症状或死鱼后,即人工感染24 h时,加入相应浓度的单过硫酸氢钾粉和对照药物三氯异氰尿酸粉药浴。施药后,参照曲克明等(2007)报道的方法并做适当改进,每隔24 h将实验池内水体交换入新水,换水量50%,水温24–27℃。试验设阴性对照组(人工细菌感染后不给药)、空白对照组(只注射0.2 ml 灭菌后的液体培养基,不给药)、单过硫酸氢钾粉试验组(设低、中、高剂量组,分别为0.1、0.25、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、对照药物三氯异氰尿酸粉组(0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。每组实验动物10尾,设3个平行重复。试验中观察记录各组实验动物的病变和死亡情况,观察10 d,死亡的实验动物应及时捞出,用死亡率表示。

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{实验组发病死亡累计数}}{\text{每组实验鱼总数}} \times 100$$

试验结果以保护率来表示,实验设定保护率在60%–85%有效。

$$\text{保护率}(\%) = \frac{\text{每组实验鱼总数} - \text{实验组发病死亡累计数}}{\text{每组实验鱼总数}} \times 100$$

### 1.2.4 数据采用

用SPSS 18.0软件进行方差分析。用Excel 2007软件进行作图。

## 2 试验结果

### 2.1 体外抑菌实验

体外抑菌实验中,只含菌液的对照组均呈阳性,无菌水对照组均呈阴性。单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌的体外抑菌实验结果见表1。

表1 单过硫酸氢钾粉的体外抑菌实验结果  
Table 1 Results of *in vitro* bacteriostatic experiment of potassium monopersulfate powder

项目 Items	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>
MIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.125 ± 0	0.25 ± 0	1.00 ± 0	0.25 ± 0	0.50 ± 0
MBC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.125 ± 0	0.25 ± 0	1.00 ± 0	0.25 ± 0	0.50 ± 0

由表1可见,药物对嗜水气单胞菌的MIC和MBC影响最低,均为0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,而对爱德华氏菌的MIC和MBC相对较高,为1.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

### 2.2 体内抑菌实验

#### 2.2.1 5种常见致病菌对鲫鱼的致死曲线

按1.2.3中所述方法给菌16–24 h后,各组鱼注射部位均出现红肿,且均有死鱼出现。对死鱼进行解剖后发现,感染嗜水气单胞菌的鲫鱼组中,典型症状表现为死鱼肠道充血,有轻微腹水;感染迟钝爱德华氏菌的组中,其症状表现为死鱼肛门红肿;感染爱德华氏菌的组中,其症状表现为死鱼注射部溃烂;感染温和气单胞菌的组中,其症状表现为死鱼皮肤有出血现象;感染荧光假单胞菌的组中,症状表现为死鱼皮肤有轻微出血、溃烂穿

孔现象。

统计体内实验中,阴性对照组平均死亡率数据,得出5种常见致病菌对鲫鱼的致死曲线。如图1所示,5种常见水产致病菌感染后的鲫鱼,皆从染菌24 h左右开始死亡,至5-7 d完全死亡。但完全致死时间各有不同,按完全死亡时间由长到短排序:感染爱德华氏菌组 > 感染荧光假单胞菌组 > 感染迟钝爱德华氏菌组 > 感染嗜水气单胞菌组 > 感染温和气单胞菌组。即感染爱德华氏菌组的鲫鱼组死亡最慢,感染温和气单胞菌的鲫鱼组死亡最快。

### 2.2.2 低剂量组单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌的抑菌实验结果

人工染菌24 h后分别按组给药。从图2可以看出,已感染5种水产动物常见致病菌的鲫鱼,在施用低剂量(0.1 μg/ml)单过硫酸氢钾粉后,以死亡率为代表的抑菌效果在第4-6天基本达到最大值,死亡率为53.3%-63.3%。按最终死亡率大小和同一时间死亡率大小综合排序:感染荧光假单胞菌组 > 感染嗜水气单胞菌组 > 感染迟钝爱德华氏菌组 > 感染温和气单胞菌组 > 感染爱德华氏菌组。但死亡率大小和死亡时间并不完全是同一规律,感染荧光假单胞菌组实验开始时其死亡率排第4,但第5天后死亡率突然上升至第1。

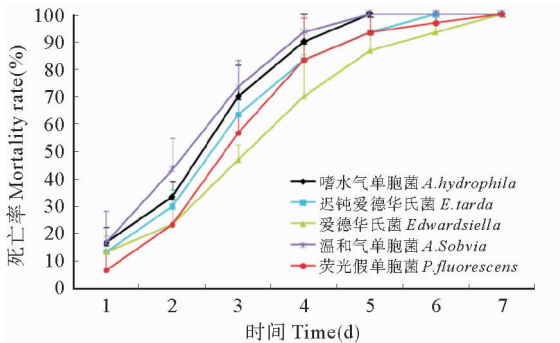


图1 5种水产动物常见致病菌对鲫鱼的累积死亡率

Fig. 1 Cumulative mortality of *C. auratus* caused by five strains of common pathogenic bacteria in aquaculture

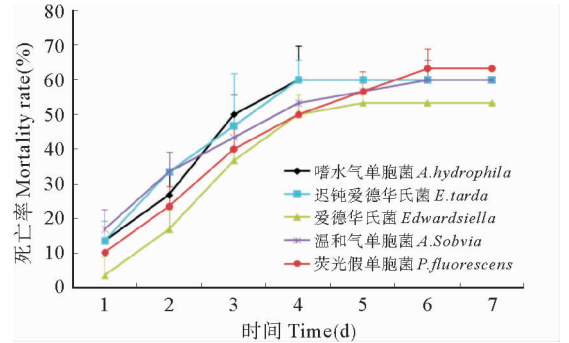


图2 低剂量组单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌感染的鲫鱼的抑菌实验

Fig. 2 Bacteriostatic experiment of low dose potassium monopersulfate powder on *C. auratus* infected by five strains of common aquatic pathogenic bacteria

### 2.2.3 中剂量组单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌的抑菌实验结果

人工染菌24 h后分别按组给药。从图3可以看出,已感染5种水产动物常见致病菌的鲫鱼,在施用中剂量(0.25 μg/ml)单过硫酸氢钾粉后,以死亡率为代表的抑菌效果,在第2-4天基本达到最大值,死亡率为23.3%-33.3%。按最终死亡率大小和同一时间死亡率大小综合排序:感染迟钝爱德华氏菌组 > 感染荧光假单胞菌组和感染嗜水气单胞菌组 > 感染温和气单胞菌组 > 感染爱德华氏菌组。

### 2.2.4 高剂量组单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌的抑菌实验结果

人工染菌24 h后分别按组给药。从图4可以看出,已感染5种水产动物常见致病菌的鲫鱼,在施用高剂量(1 μg/ml)单过硫酸氢钾粉后,以死亡率为代表的抑菌效果,在第3天基本达到最大值,死亡率为16.6%-30.0%。按最终死亡率大小和同一时间死亡率大小综合排序:感染迟钝爱德华氏菌组 > 感染嗜水气单胞菌组 > 感染荧光假单胞菌组 > 感染爱德华氏菌组 > 感染温和气单胞菌组。

### 2.2.5 体内抑菌实验结果

统计各种菌感染的各组鱼死亡数据,得出10 d保护率。单过硫酸氢钾粉对5种水产动物常见致病菌的体内抑菌实验结果见表2。

## 3 讨论

在体外抑菌实验中,单过硫酸氢钾粉对爱德华氏菌、温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、荧光

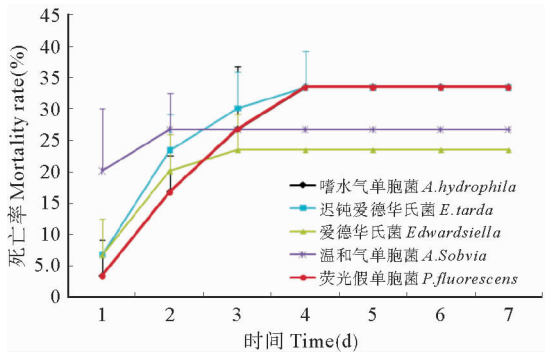


图 3 中剂量组单过硫酸氢钾粉对 5 种水产动物常见致病菌感染的鲫鱼的抑菌实验

Fig. 3 Bacteriostatic experiment of medium dose potassium monopersulfate powder on *C. auratus* infected by five strains of common aquatic pathogenic bacteria

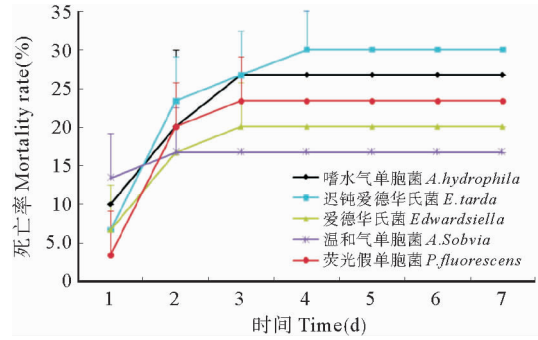


图 4 高剂量组单过硫酸氢钾粉对 5 种水产动物常见致病菌感染的鲫鱼的抑菌实验

Fig. 4 Bacteriostatic experiment of high dose potassium monopersulfate powder on *C. auratus* infected by five strains of common aquatic pathogenic bacteria

表 2 单过硫酸氢钾粉的体内抑菌实验结果

Table 2 Results of *in vivo* bacteriostatic experiment of potassium monopersulfate powder

给药剂量 Dosage (μg/ml)	10 d 保护率 (%) Protection rate on 10 d				
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobvia</i>	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>
0.1	40 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	46.7 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	36.7 <sup>a</sup>
0.25	66.7 <sup>b*</sup>	66.7 <sup>b**</sup>	76.7 <sup>b*</sup>	73.3 <sup>b**</sup>	66.7 <sup>b**</sup>
1	73.3 <sup>b**</sup>	70 <sup>b**</sup>	80 <sup>b**</sup>	83.3 <sup>b***</sup>	76.7 <sup>b***</sup>
空白 Blank	—	—	—	—	—
对照 Control	66.7 <sup>b*</sup>	76.7 <sup>b**</sup>	73.3 <sup>b*</sup>	66.7 <sup>b**</sup>	70 <sup>b**</sup>
阴性 Negative	0	0	0	0	0

注:比较不同浓度药品组间保护率的强弱,其中与 0.1 μg/ml 比较, \* .  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ , \*\*\* .  $P < 0.001$ 。保护率的上标字母,相同表示差异不显著,不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Protection rates of different dose groups were compared with that of the 0.1 μg/ml group. \* .  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ , \*\*\* .  $P < 0.001$ . Different superscripts mean significant difference between groups. Same superscripts mean no significant difference

假单胞菌均有明显的抑制作用,其对 5 种菌的 MIC 分别为 1、0.25、0.125、0.25、0.5 μg/ml; MBC 与 MIC 相同。根据刘小燕等 (2005) 报道,二氧化氯对嗜水气单胞菌的 MIC 为 0.17 μg/ml, MBC 为 0.23 μg/ml。根据李海燕 (2006) 报道,溴氯海因对嗜水气单胞菌嗜水亚种 (*Aeromonas hydrophila hydrophila*)、荧光假单胞菌及迟钝爱德华氏菌 3 种菌的最小抑菌浓度,分别为 0.312 5、0.156 0、0.312 5 μg/ml。可以推断,在实验室条件下,单过硫酸氢钾与二氧化氯和溴氯海因具有相近的体外抑菌能力。

在体内抑菌实验中,感染了 5 种水产致病菌的鲫鱼,分别体现出各种菌致病后典型的发病特征 (储卫华等 2000; 孙峰等 2005; 陈翠珍 2004; 胡秀彩等 2008; 张玉明等 2010)。由 10 d 保护率数据统计可得,实验中被 5 种水产致病菌感染后的鲫鱼组,在施用不同剂量的单过硫酸氢钾粉情况下,部分鱼得以存活。浓度为 0.25 μg/ml 和 1.0 μg/ml 组与对照组保护率差异不显著 ( $P > 0.05$ ),而 0.1 μg/ml 浓度组与对照组保护率差异显著 ( $P < 0.05$ )。说明在实验条件下,0.25 μg/ml 和 1.0 μg/ml 实验组与对照组对感染了 5 种水产致病菌的鲫鱼,具有相近的保护效果。按照保护率在 60%–85% 有效这一规则,从兼顾经济性和有效性的角度出发,在临床上可以选择 0.25 μg/ml 浓度,药浴由嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、爱德华氏菌、温和气单胞菌和荧光

假单胞菌引起病害的鲫鱼,将有治疗作用。

从各浓度单过硫酸氢钾粉对5种水产致病菌的体内体外抑菌实验数据可知,同一致病菌在体内和体外实验中,对加入的抑菌剂体现出不同的敏感性。结果显示,嗜水气单胞菌在体内实验中致死性较高,即使高剂量的杀菌剂亦不能有效控制其发病死亡率,但在体外实验中对药物却最敏感,低剂量的杀菌剂就可抑制其活性;而爱德华氏菌在体内实验中致死性较低,而在体外实验中对药物不敏感。这可能与各种菌在鲫鱼体内的主要作用位点和致死机理不同有关,同时也与各菌种对单过硫酸氢钾粉的敏感度不同有关。单过硫酸氢钾粉对这5种致病菌具体的抑菌机理还需要在进一步的研究中探寻。

## 参 考 文 献

- 孙峰,张煜,李立德,刘云. 2005. 感染嗜水气单胞菌对鲫鱼非特异性免疫功能的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版),35(5):815-818,822
- 李海燕. 2006. 溴氯海因对鱼类的急性毒性试验及治疗效果. 广州大学学报(自然科学版),5(3):26-30
- 李继耀. 2012. 规模化养猪场消毒方案探析. 畜牧兽医杂志,31(3):74,76
- 刘小燕,王冬武,杨志. 2005. 二氧化氯和三氯异氰尿酸对鱼类3种致病菌的杀灭试验. 内陆水产,30(7):38-40
- 曲克明,徐勇,马绍赛,李健. 2007. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应. 海洋水产研究,28(4):83-88
- 阳艳林,隆雪明. 2008. 过硫酸氢钾复合粉消毒作用试验研究. 中国兽药杂志,42(3):34-36
- 陈翠珍. 2004. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病(综述). 河北科技师范学院学报,18(3):70-76
- 陈小强,王晶钰,张中航,闻志丹. 2011. 规模化鸡场消毒剂的筛选与消毒效果评价. 动物医学进展,32(11):85-89
- 汪开毓,耿毅,卢明科,钟妮娜. 2000. 百毒杀(BESTAQUAM-s)对鲤鱼、鲫鱼的急性毒性和抑菌作用. 四川农业大学学报,18(1):68-71
- 张文福. 1992. 过氧化氢消毒研究进展. 中国消毒学杂志,9(3):179-184
- 张跃华,邹春颖,张姣,何春雷,冉超. 2006. 过硫酸氢钾复合盐在食用菌生产中的应用研究. 农业环境科学学报,25(Z1):280-282
- 张玉明,周志明,潘晓艺. 2010. 光唇鱼赤皮病病原研究. 上海海洋大学学报,19(5):631-634
- 胡秀彩,吕爱军,陈宏. 2008. 产色素温和气单胞菌的特性及其外膜蛋白型研究. 安徽农业科学,36(8):3240-3241,3438
- 储卫华,陆承平. 2000. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性. 南京农业大学学报(自然科学版),23(2):80-84
- 颜新敏,张强,朱海霞,李建,吴国华. 2005. 常用消毒剂对口蹄疫病毒的灭活试验. 中国消毒学杂志,25(2):120-122
- Sharma VK. 2002. Potassium ferrate(VI): an environmentally friendly oxidant. Adv Environ Res 6(2):143-156