

四羟甲基硫酸磷对日本鳗鲡的急性毒性及杀菌性能试验

林明辉¹, 刘春花¹, 陈道印², 黄志斌^{*}, 孙保兴³ (1 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510280 2 南昌县莲塘鱼病防治所, 江西南昌 330200 3. 广州市畅洋绿色动物药品有限公司, 广东广州 511450)

摘要 [目的]探讨四羟甲基硫酸磷 (THPS)作为一种新型季磷盐杀生剂对日本鳗鲡的毒性作用以及杀菌效果。[方法]在室内常温静水条件下,进行 THPS对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)急性毒性试验,以及 THPS对柱形屈绕杆菌(*F. columnaris*)的杀菌性能试验。计算 THPS的半致死浓度(LC₅₀)、24 h安全浓度(Sc)、对柱形屈绕杆菌的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)以及杀菌率。[结果]THPS的24、48和96 h的LC₅₀分别为11.9、9.9和9.1 mg/L; Sc为2.1 mg/L; MIC和MBC分别为0.36和0.72 mg/L;浓度为0.7 mg/L,作用12 h的杀菌率达100.0%,药效持久,且受pH值影响极小。[结论]新型季磷盐杀生剂对防治鳗鲡细菌性疾病安全、有效,值得推广。
关键词 四羟甲基硫酸磷; 日本鳗鲡; 柱形屈绕杆菌; 急性毒性; 杀菌性能
中图分类号 S482.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2011)06-03647-02

Acute Toxicity Test of Japanese eel and Bactericidal Property Test of Tetrakis Hydroxymethyl Phosphonium Sulfate
L N Minghui et al (Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences Guangzhou Guangdong 510280)
Abstract [Objective] To understand the toxicity and sterilizing effects of the tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS) as a novel quaternary phosphonium biocide [Method] Under hydrostatic conditions at RT, the acute toxicity test of Japanese eel and the bactericidal property test of THPS on the *F. columnaris* were carried out. And then the semi-lethal concentration (LC₅₀), safe concentration (Sc), minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and the sterilizing rate of THPS were calculated, respectively. [Result] The LC₅₀ of THPS at 24, 48 and 96 h were 11.9, 9.9 and 9.1 mg/L, respectively. The Sc of THPS at 24 h was 2.1 mg/L; the MIC and MBC of THPS to the *F. columnaris* were 0.36 and 0.72 mg/L; and the sterilizing rate was 100.0% at a concentration of 0.7 mg/L and 12 h. The sterilizing rate of THPS had no great change with pH values varying from 5.5 to 9.5. [Conclusion] The THPS is a novel, safe and effective biocide for prevention and treatment of bacterial diseases of Japanese eel.
Key words Tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate; Japanese eel (*Anguilla japonica*); *F. columnaris*; Toxicity; Bactericidal property

季磷盐类杀生剂是一种新型的高效广谱水处理杀菌剂。其分子结构与季铵盐相似,只是用含磷的阳离子代替了含氮的阳离子。有研究表明,带有长烷基链的季磷盐具有更佳的抗菌活性^[1]。季磷盐类杀生剂属于阳离子表面活性剂杀菌剂。其杀菌机理为该类药物中带正电荷的有机阳离子可选择性地吸附带负电荷的细菌,或聚集在细胞壁上,导致细菌生长受抑而死亡^[2];或通过渗透和扩散作用进入细胞膜,阻碍细胞膜的半渗透作用,进一步穿入细胞内部,抑制蛋白酶的生成,从而使蛋白质钝化,以达到杀菌的作用^[3];另外,其亲油基团能溶解并损伤细菌表面的脂肪壁,改变细菌原生质膜的物化性质,亲油基的溶解性能越好,越有利于破坏细菌原生质膜,从而加速细菌的死亡^[4]。中国水产科学研究院珠江水产研究所的科技人员根据四羟甲基硫酸磷 (THPS)的药理学原理,研究了其作为一种鳗用新型季磷盐类杀生剂的杀菌效果。结果表明,THPS对鳗鲡烂鳃病、爱德华菌病等细菌性疾病有良好防治功效。为了探讨鳗鲡对THPS的药物敏感性,掌握THPS用于生产上的安全浓度,笔者进行了THPS的急性毒性试验及杀菌性能试验,以期对季磷盐类药物的临床应用、鳗鲡的病害防治提供科学依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验鱼类 试验用日本鳗鲡来源于广东台山一养鳗场培育的一龄鱼,体长20~25 cm,于室内试验水箱驯养7 d。试验水箱容量为120 L,采用充分曝气3 d以上的自来水,水温20~28℃,pH值为7.0~7.2,溶解氧5.4~7.0 mg/L。试

验期间不投饵。
1.2 药物及菌种 新型季磷盐杀生剂(主要成分为THPS)由中国水产科学研究院珠江水产研究所自行研发。柱形屈绕杆菌(*F. columnaris*)菌种由珠江水产研究所鱼病室鉴定、提供^[5]。
1.3 急性毒性试验 将日本鳗鲡经肉眼检查、确定正常后用于试验,随机分组。经预试验确定药物的试验浓度范围,按照等对数间距法进一步优化试验,设定6个不同浓度梯度组和1个空白对照组,每组10尾鱼,设平行试验3组。分别在24、48、72和96 h记录试验结果。试验期间不投饵,及时清污,每12 h换水、施药1次以保证试验期间药物浓度基本一致。采用直线内插法计算24、48和96 h的半致死浓度(LC₅₀);根据Turabell公式计算出24 h安全浓度(Sc)^[6-7]。

$$Sc = 48\text{ h } LC_{50} \times 0.3 / (24\text{ h } LC_{50} / 48\text{ h } LC_{50})^2 \quad (1)$$

1.4 杀菌性能试验 采用二倍稀释法^[8]将THPS稀释并与无菌肉汤培养基混合,配制成7个2倍系列浓度梯度(0~2.88 mg/L)的混合溶液,每组混合液3 mL。将已分离、纯化的柱形屈绕杆菌制成菌悬液,取0.1 mL菌悬液接种到各组混合液中,混匀后于28℃恒温箱培养,分别于接种后10、20和30 min以及1、24和48 h观察细菌的生长状况。测定THPS对柱形屈绕杆菌的最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)。

杀菌率是评价杀菌剂的杀生性能的重要指标。取200 mL菌液(10⁵~10⁷个/mL),分装于500 mL三角烧瓶中,采用平皿菌落计数法测定柱形屈绕杆菌起始菌数。将试样瓶编号,设定不同浓度、作用时间和pH条件下THPS的杀菌试验。每瓶加入相应的不同浓度的THPS溶液,充分摇匀,于28℃恒温条件下培养,药剂加入后的第1、4、8、12、16、20和24 h分别测定各试样瓶的存活菌数。根据公式(2)计算

基金项目 农业部公益性行业科研专项(200803013);珠江水产研究所所长基金(2007-G-6)。
作者简介 林明辉(1981-),男,福建莆田人,助理研究员,从事水产药物与病害防治研究。* 通讯作者,博士,研究员, E-mail: Lmnh8@163.com。
收稿日期 2010-11-30

THPS在不同条件下的杀菌率^[9]。

杀菌率 = [(在一定时间下空白样的菌数 - 同一时间下
存活菌数) / 在一定时间下空白样的菌数] ×
100% (2)

1.5 生产性防治试验 广东潮州某养殖场, 精养体重为 0.2~0.4 kg 的日本鳊 0.6 hm², 共 6 个池。2009 年 5 月, 2 个池内鳊摄食减少且连续死亡, 日死亡率超过 3%。经检测发现鳊鳃丝溃烂, 颜色苍白, 经病原菌分离鉴定为柱形屈绕杆菌感染, 感染率为 23%。对其中 1 个池施用新型季磷盐

杀虫剂 THPS 用量为 0.75 mg/L, 溶于水后全池泼洒, 连续使用 2 d, 保持水温 24~28 ℃, pH 值 7.2~7.4。

2 结果与分析

2.1 THPS对日本鳊的急性毒性试验 日本鳊在施药后的急性中毒症状为鱼体色发黑, 体表粘液增多, 狂躁不安, 浮头, 游动失去平衡, 侧游, 翻转等, 重症鱼死亡。各组在不同时间点的死亡数和平均死亡率见表 1。THPS 对日本鳊的 24、48 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 11.9、9.9 和 9.1 mg/L。THPS 的 24 h 安全浓度为 2.1 mg/L。

表 1 THPS对日本鳊的急性毒性试验
Table 1 Effects of THPS on the acute toxicity of *A. japonica*

THPS mg/L	24 h死亡鱼数			48 h死亡鱼数			72 h死亡鱼数			96 h死亡鱼数			平均死亡率// %
	Number of dead fish at 24h			Number of dead fish at 48h			Number of dead fish at 72h			Number of dead fish at 96h			Average
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	death rate
4.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
6.0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	16.7
7.8	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	30.0
10.1	2	3	2	3	2	2	1	2	1	1	1	1	70.0
13.2	5	6	6	5	3	4	-	1	-	-	-	-	100.0
17.1	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0
空白对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Blank control													

2.2 THPS对柱形屈绕杆菌的杀菌性能评价 经 24 h 培养后, 无菌生长的 THPS 浓度即为 MIC; 继续培养 24 h 后, 同样观察, 仍无菌生长的 THPS 浓度即为 MBC^[10]。结果显示, THPS 对日本鳊烂鳃病原菌柱形屈绕杆菌的 MIC 和 MBC 分别是 0.36 和 0.72 mg/L (表 2)。

配制不同浓度的 THPS 进行柱形屈绕杆菌的杀菌试验, 杀菌时间为 12 h。不同 THPS 浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 mg/L) 的杀菌率分别为 43.4%、69.2%、85.7%、96.3%、99.1% 和 100.0%。THPS 的杀菌率是随着试剂浓度的增加而升高, 当 THPS 浓度为 0.6 mg/L 时, 杀菌效果可达 100%。

使用浓度为 0.7 mg/L 的 THPS 溶液, 测定不同时间段的杀菌率。在 1、4 和 8 h 时, 其杀菌率分别为 68.6%、88.1% 和 97.9%。THPS 在作用 12 h 时的杀菌率已达 100.0%, 且药效持续效果很好, 在 24 h 后细菌没有再生, 药效持续。

表 2 THPS对柱形屈绕杆菌的 MIC 和 MBC
Table 2 Minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration of THPS to *F. columnaris*

THPS 浓度 / mg/L THPS concentration	培养时间 / Culture time					
	10 min	20 min	30 min	1 h	24 h	48 h
0	+	+	+	+	+	+
0.09	+	+	+	+	+	+
0.19	+	+	+	+	+	+
0.36	+	+	+	+	+	+
0.72	-	-	-	-	-	+
1.44	-	-	-	-	-	-
2.88	-	-	-	-	-	-

注: “-”表示不长菌, “+”表示长菌。
Note: “-” indicates no bacteria, “+” indicates bacteria.

用盐酸和氢氧化钠调节 THPS 溶液的 pH 值, THPS 浓度为 0.7 mg/L, 作用 12 h 后测定不同 pH 值下的杀菌率。在

pH 值为 5.5、6.5、7.5、8.5 和 9.5 时, THPS 的杀菌率分别为 98.7%、100%、100%、100% 和 97.3%。随着 pH 值的变化, THPS 的杀菌率没有明显的波动, 其 pH 值容忍度很高。

2.3 生产性防治效果 施用新型季磷盐杀生剂 2 d 后, 鳊死亡率降到 2% 以下, 摄食量增加, 7 d 后无死亡现象发生。未施药的其他池内鳊病情加重, 并呈爆发性死亡现象。表明新型季磷盐杀生剂对鳊烂鳃病有良好的治疗效果, 在生产上的推荐用量为 0.45~0.75 mg/L。

3 结论与讨论

试验结果表明, 高浓度 THPS 药物对日本鳊有急性毒性作用, 其对日本鳊的 24 h 安全浓度与对柱形屈绕杆菌的 MIC 和 MBC 相差较大。因此, 在实际应用中应把握好 THPS 的用量, 避免造成养殖鳊的急性中毒。杀菌率是评价杀生剂性能的一项重要指标^[11]。试验采用鳊常发病的病原菌——柱形屈绕杆菌为材料, THPS 浓度高于 0.4 mg/L 时有很好的杀菌效果, 当浓度为 0.7 mg/L, 作用 12 h 后的杀菌率可达 100.0%, 且其 pH 值容忍度很高。因此, THPS 对鳊细菌病的防治有显著效果。

在选择防治水产养殖动物疾病的药物时, 除了需要考虑药物防治疾病的效果之外, 还必须要考虑药物对养殖环境的影响。作为一种新型季磷盐型杀生剂, THPS 具有高效、广谱、低剂量、低毒、良好的配伍性、宽广的 pH 值使用范围、对环境安全及克服细菌抗药性等优点^[12]。与传统的杀生剂相比, THPS 易降解, 没有毒性积累效应, 是环境友好型杀生剂, 已被批准代替毒性较高的杀生剂用于环境敏感区域。因此, 新型环保的季磷盐杀生剂有着广阔的应用前景, 在防治水产动物病害的应用方面值得深入研究。

(下转第 3689 页)

环经济模式(图1)^[3]。

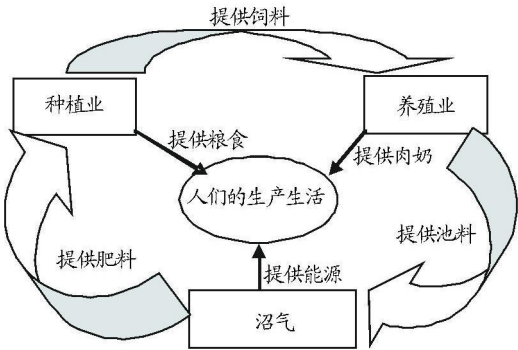


图1 正定县新城铺镇村民生产生活模式

Fig 1 Production and life mode of the villagers in Xinchengpu Town of Zhengding County

3 新农村建设中民生科技体系构成

通过对新城铺镇村民生产生活模式的分析发现,村民生产生活所需的民生科技支撑体系应包括3个方面的科技:与种植业密切相关的科技;与养殖业密切相关的科技;与沼气建设使用相关的科技。其中,沼气技术是将养殖业和种植业实现无缝对接的关键,因此该技术是民生科技支撑体系的核心技术。

3.1 与种植业密切相关的科技 种植业所需要的科技主要涉及适宜良种的选择和推广、农业节水技术、高效施肥技术、科学使用农药技术等。首先,农户已经充分认识到,优良品种是农业实现高产、高效、优质目标的基础和关键。为了提高农作物种植效益,在相关技术部门指导下,主动寻找农作物新品种。其次,现代农民已经不再仅仅依靠祖辈传授进行农业生产,而是积极学习并接受新的科学技术,按照技术要求来管理大田作物。

3.2 与养殖业密切相关的科技 目前,农村的养殖业正在向规模扩大、设施完善、管理科学方向发展。在养殖管理过程中,要保证牛、猪等品种优良、健康、高产,必须有先进的科技支撑。以奶牛养殖为例,涉及的养殖科技主要包括秸秆青贮、精液冷冻、人工授精、配方饲料、科学喂养、畜病防治、牛奶保鲜等技术,这些技术是与奶牛养殖设施结合。具体来说,奶牛场设施主要包括挤奶设备、青粗饲料加工调制设备、

青贮设备、储存及运输设备、粪尿及污水处理设施、环保设备、消防设施、消毒设施、给排水设施、牛乳贮藏及初加工设施、兽医诊疗器械等。

3.3 与沼气建设使用相关的科技 沼气技术符合循环经济“减量化、无害化、资源化和生态化”的原则,可以很好地将种植业产生的农作物秸秆、养殖业产生的牲畜粪、尿等废弃物通过相应技术处理转化为清洁的能源和有机肥料,大大地减少了环境污染,优化了人们的生产生活环境^[4]。

沼气建设主要的工艺技术包括废水的收集处理、发酵原料的预处理、废水的厌氧消化、沼气的贮存与利用、有机肥加工等技术。

沼气技术将养殖业产生的大量牲畜粪尿通过“无害化、资源化”处理,就地收集,就地处理,就地加工,转换为人们生活所用能源和种植业所需的有机肥料,从而有效减少了养殖业对环境、水源和土壤的污染,实现了清洁、绿色、环保生产,明显提高了人们的生活质量。沼气是连接养殖业和种植业的桥梁和纽带,因此,沼气技术就是该地区生产生活新模式形成和建立的核心技术。

4 结论

农业既要满足社会对农产品数量和质量的需求,承载城市经济、社会可持续发展的保障功能,又要承担资源环境的涵养功能。新农村建设中的民生科技支撑体系就成为解决资源环境有限性与社会经济发展旺盛要求之间矛盾的必然选择。民生科技的推广应用,可以有效解决发展农业带来的土壤、水源、空气等环境污染问题,改高耗低效的资源型生产为低耗高效的科技型生产,大幅度提高农业资源利用率和经济产出率,从根本上解决农业资源短缺和持续利用问题,减少对环境的负面影响。

参考文献

[1] 赵惠. 基于循环经济的新农村发展模式探析[J]. 中州学刊, 2007(9): 48-50
[2] 郭立永, 姜涵. 开展节能减排促进农村经济可持续发展[N]. 吉林日报, 2009-02-19(8).
[3] 洪继曾. 农村清洁生产与循环经济[J]. 中国人口·资源与环境, 2008(1): 3-5
[4] 胡霞. 论循环经济视角下的新农村建设[J]. 中国农村小康科技, 2007(5): 14-16

(上接第3648页)

参考文献

[1] AK H KO K, TOM K I TAKESH I E. Synthesis and antinicrobial activity of dimethyl and trimethyl substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994 38(5): 945-952
[2] 王锦堂. 我国工业用水新杀菌剂的结构特点与合成方法[J]. 现代化工, 2001 21(10): 9-12
[3] 李本高. 循环冷却用水用杀菌剂季磷盐[J]. 石油炼制, 1993 24(12): 53-57
[4] 王锦堂. 表面活性剂和水处理药剂[J]. 2001年大连国际给排水设备展览会暨全水处理技术研讨会论文集. 大连[出版者不祥], 2001 53-56
[5] 余新. 鳊鱼养殖[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1988 268-269
[6] 湛江水产专科学校. 淡水养殖水化学[M]. 北京: 农业出版社, 1983 239-241
[7] 程树培. 环境生物技术实验指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995 285
[8] 郑润泉, 丁桂枝. 水溶液和NaCl溶液浓度对泥鳅受精率的影响[J]. 水

产养殖, 1990(3): 16
[9] 李卓棣, 胡正嘉. 微生物学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001 178
[10] 刘文卿. 实验设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005 103-125
[11] 杨德红, 严莲荷, 叶静娴. 杀菌剂性能评价的研究[J]. 化工时刊, 1999 13(9): 14-16
[12] 张静, 黄种买. 一种新型环境友好杀生剂——四羟甲基硫酸磷[J]. 工业水处理, 2004 24(11): 13-15
[13] WANG Q W, LI J Y, NIU J R, et al The acute toxicity test in mice and bacteriostasis in vitro of Yandureqing and its microemulsion[J]. Agricultural Science & Technology, 2008 9(5): 113-117
[14] 阮祥春, 曾明华, 韦洋. 藤茶黄酮对小鼠的急性中毒试验[J]. 畜牧与饲料科学, 2009 30(3): 86
[15] JIANG G C Study on the acute toxicity and genetics toxicity of bensulfuron-methyl on Danio rerio[J]. Agricultural Science & Technology, 2009 10(4): 128-131
[16] 段小卫, 王娜. 亚急性猪丹毒的诊断与治疗[J]. 畜牧与饲料科学, 2010 31(1): 183