

DOI:CNKI:61-1390/S.20110907.1053.009

网络出版时间:2011-09-07 10:53

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110907.1053.009.html>

杀灭鱼类单殖吸虫药物筛选方法的建立

张超¹, 赵云奎², 凌飞¹, 王高学¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 汉中市水产实验站, 陕西 汉中 723003)

【摘要】 【目的】建立活体杀灭鱼类单殖吸虫药物筛选及药效评价的方法。【方法】通过活体杀虫的方法, 测试甲苯咪唑、吡喹酮对 6 种常见单殖吸虫(拟指环虫、坏鳃指环虫、中型指环虫、小鞘指环虫、鲢指环虫、伸展指环虫)的杀灭活性。首先用甲苯咪唑、吡喹酮、二硫氰基甲烷和氟甲砒霉素对试验鱼进行预处理, 获得无虫鱼, 以备感染试验用; 然后对 5 种指环虫(坏鳃指环虫、中型指环虫、小鞘指环虫、鲢指环虫、伸展指环虫)进行纯化, 再连同拟指环虫一并并进行相应寄主感染试验, 评价各种单殖吸虫的感染率和感染强度(以聚集指数表示); 最后在不同的条件下对单殖吸虫进行活体保种试验, 考察最佳的保种条件。【结果】自然条件下, 寄生于金鱼的坏鳃指环虫、中型指环虫和寄生于欧洲鳗鲡的拟指环虫感染率均达到 100%。药敏试验中, 在相同质量浓度甲苯咪唑下, 伸展指环虫、小鞘指环虫、坏鳃指环虫和鲢指环虫均比较敏感, 在 0.7 mg/L 时均被完全杀灭, 中型指环虫和拟指环虫相对不敏感, 在试验最高质量浓度 0.8 mg/L 时仍未被完全杀灭, 杀灭率分别为 97.0% 和 90.5%; 在相同质量浓度吡喹酮下, 拟指环虫较其他 5 种指环虫更敏感, 在 2.2 mg/L 时即被完全杀灭, 而中型指环虫、坏鳃指环虫、小鞘指环虫、鲢指环虫和伸展指环虫在试验最高质量浓度 2.4 mg/L 时, 仍未被完全杀灭, 杀灭率分别为 86.9%, 82.7%, 81.8%, 81.4% 和 56.3%。感染试验中, 拟指环虫对欧洲鳗鲡的感染率最高, 达 100%, 聚集指数为 5.9; 其次是中型指环虫感染金鱼, 感染率为 97%, 聚集指数为 5.0。单殖吸虫保种试验表明, 水温在 20℃ 时各种单殖吸虫的感染率均能达到 100%, 且鱼的死亡率较低, 是最佳的保种水温。【结论】选择体型小、价格低、易获得的金鱼及其寄生的中型指环虫作为药物筛选的指示生物, 可进行杀灭鱼类单殖吸虫的药物筛选工作。

【关键词】 单殖吸虫; 杀虫药物筛选; 金鱼; 中型指环虫

【中图分类号】 S942.92

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)10-0028-07

Establishment of a screening method for drugs against monogenean

ZHANG Chao¹, ZHAO Yun-kui², LING Fei¹, WANG Gao-xue¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Aquatic Experiment Station of Hanzhong, Hanzhong, Shaanxi 723003, China)

Abstract: 【Objective】 The present study was designed to establish a solid method aiming to screen drugs against monogenean *in vivo* and evaluate the antiparasitic activity. 【Method】 Firstly, sensitivity assay was performed using mebendazole and praziquantel on fishes infected with monogenea to evaluate the sensitivity of six different species of monogenean (*Pseudodactylogyrus*, *Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus intermedius*, *Dactylogyrus vaginulatus*, *Dactylogyrus hypophthalmichthys* and *Dactylogyrus extensus*). Secondly, pretreatment with mebendazole, praziquantel, dithionitrile methane and florfenicol was performed for the preparation of free-parasite fishes. Thirdly, purification and infection tests of different *Dactylogyrus* were conducted to investigate the infection rate and infection conducted intensity (indicated by aggregation

* [收稿日期] 2011-03-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31072242); 陕西省农业攻关项目(2010K02-09-3); 国家大学生创新性实验计划项目(091071213)

[作者简介] 张超(1988—), 男, 河北保定人, 主要从事水产动物病害研究。

[通信作者] 王高学(1965—), 男, 陕西富平人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事水产动物病害研究。

E-mail: wanggaixue@126.com

index) of different species. At last, parasites conservation *in vivo* was conducted to study the best conditions for monogenea conservation. 【Result】 Under natural conditions, all the infection rates of *D. vastator* and *D. intermedius* to goldfish (*Carassius auratus*) and *Pseudodactylogyrus* to *Anguilla anguilla* were 100%. In the sensitivity test, *D. extensus*, *D. vastator*, *D. vaginulatus*, and *D. hypophthalmichthys* were more sensitive for the same dose of mebendazole and they were completely killed at 0.7 mg/L, but *D. intermedius* and *Pseudodactylogyrus* were relatively insensitive and they were not killed completely with the killing rates of 97.0% and 90.5%. *Pseudodactylogyrus* was apparently sensitive for the same dose of praziquantel and was completely killed at 2.2 mg/L; but *D. intermedius*, *D. vastator*, *D. vaginulatus*, *D. hypophthalmichthys* and *D. extensus* were relatively insensitive and were not killed completely with the killing rates of 86.9%, 82.7%, 81.8%, 81.4% and 56.3%. It was also observed that the highest infection rate occurred in *A. anguilla* infected with *Pseudodactylogyrus*, in which infection rate was 100% and aggregation index was 5.9, followed by the goldfish infected with *D. intermedius*, with the infection rate and aggregation index of 97% and 5.0 respectively. Monogenea conservation test proved that all the infection rates of the six monogenean could reach 100% at 20 °C and the mortality of fish was relatively lower at this temperature. 【Conclusion】 Goldfish with small body, cheap price and easy access and infected *D. intermedius* as the indicative creature were used for the research of drugs screening to control the monogenean.

Key words: monogenean; drugs screening; goldfish; *Dactylogyrus intermedius*

寄生于鱼类的单殖吸虫(Monogenean)主要是指环虫(*Dactylogyrus*)、拟指环虫(*Pseudodactylogyrus*)和三代虫(*Gyrodactyliasis*)等,由此引起的单殖吸虫病是养殖鱼类苗种阶段的常见病害之一。自2006年新的国家标准施行以来,许多用于水产养殖病害防治的药物由于存在疗效、食品安全以及生态安全等问题被禁止使用,而有限的几种国标药物如敌百虫(Mettriphonate)、甲苯咪唑(Mebendazol)、吡喹酮(Praziquantelum)等也因长期、超剂量使用导致产生了耐药性,这使得水产养殖病害防治的难度加大。为了保障水产养殖业的健康发展,筛选、研制无公害新渔药显得非常必要。目前,有关鱼类单殖吸虫的研究主要集中在生态位^[1]、感染方式^[2-3]、种间关系^[4-5]、寄生虫-宿主的相互关系^[6]等生态学方面,仅有少量研究对其病理及防治进行了探讨^[7-9],且这些研究未能建立防治单殖吸虫病的药物筛选方法。前期研究发现,采用离体杀虫方式测试药效时,由于指环虫离体存活时间较短,且容易死亡,因此药物的离体杀虫结果只能作为筛选杀虫药物时评价药效的参考^[10],并不能真实地反映药物在实际应用中的效果。所以建立准确、可靠的活体感染、活体杀虫方法对于药物的筛选尤为重要。本试验以感染活体鱼的单殖吸虫为材料,分别测定了不同种类单殖吸虫对常见杀虫药物的敏感性及对寄主的感染率、感染强度,并探究了单殖吸虫活体保种的最佳条件,以制定筛选杀虫药物的基本方法,旨在为

今后杀虫药物药效检测提供行之有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用鱼 健康的鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲤(*Cyprinus carpio*)来源于宝鸡市揉谷鱼种场,体质量(50 ± 2) g;金鱼(*Carassius auratus*)来自陕西省水产研究所观赏鱼养殖场,体质量(5.0 ± 0.9) g;欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)由福建省福清市智胜养鳗场提供,体质量(10 ± 1) g。

1.1.2 主要试剂及仪器 主要试剂:甲酸、无水乙醇、牛肉膏、蛋白胨等,均为国产分析纯;氟甲砜霉素(Florfenicol),99%,上海江莱公司;左氧氟沙星(Levofloxacin Hydrochloride),99%,随州天丰化工科技有限公司;二硫氰基甲烷(MBT),98%,河南佳鑫化工有限公司;甲苯咪唑(Mebendazol),99.8%,陕西汉江制药厂;吡喹酮(Praziquantelum),96.5%,南京制药厂。

主要仪器: BX-41 Olympus 双筒显微镜(Japan),倒置显微镜,体视显微镜,隔水式恒温培养箱,水族箱,光照培养箱,生化培养箱,控温加热棒等。

1.2 无虫鱼的培养

取健康鲤、欧洲鳗鲡、金鱼、鲢鱼等4种苗种,抽样镜检,如果发现感染车轮虫(*Trichodina*)等原虫,则用二硫氰基甲烷按照质量浓度梯度0.1,0.3和0.5 mg/L药浴48 h,镜检寄生原虫存活情况。再对

上述无原虫的鱼进行镜检,若发现感染单殖吸虫,在预试验的基础上,对鲤、鲢鱼和金鱼均用甲苯咪唑按照 0.9,1.1,1.3 和 1.5 mg/L 质量浓度梯度药浴 48 h,以杀灭其感染的指环虫;欧洲鳗鲡用吡喹酮按照 1.8,2.0,2.2 和 2.4 mg/L 质量浓度梯度药浴 48 h,以杀灭其感染的拟指环虫;清除寄生虫后的鱼再经 5 mg/L 氟甲砜霉素药浴 4 h,暂养 7 d 备用。

1.3 自然条件下单殖吸虫感染率与聚集指数的检测

于指环虫发病高峰季节(8—9 月份),从陕西西安、渭南、咸阳、宝鸡等地的养殖场,采集寄生坏鳃指环虫(*D. vastator*)和中型指环虫(*D. intermedius*)的金鱼、寄生鲢指环虫(*D. hypophthalmichthys*)和小鞘指环虫(*D. vaginulatus*)的鲢与寄生伸展指环虫(*D. extensus*)的鲤;同时从福建福清市智胜养鳗场采集感染拟指环虫(*Pseudodactylogyrus*)的欧洲鳗鲡。每种鱼采样(350±10)尾,从中抽样镜检 50 尾,统计各种指环虫或拟指环虫的自然感染情况,计算感染率和聚集指数,分析自然条件下的感染规律。感染率=(镜检感染寄生虫鱼数量/全部镜检的鱼数量)×100%,聚集指数=样本中寄生虫总数/样本量^[11-12]。

1.4 指环虫的纯化及培养

选择感染不同指环虫的鲢鱼、鲤、金鱼苗种各 10 尾,分别养殖在含 5 mg/L 左氧氟沙星的水体中,每天更换含药新水 1 次,连续养殖 10 d。取试鱼,无菌下采用脊柱切断法处死,取下每个鳃瓣置无菌培养皿中,并用含青霉素钠(1 000 IU/mL)和硫酸链霉素(1 000 IU/mL)的体积分数 0.65%生理盐水轻轻反复冲洗 2~3 次,再移至含有体积分数 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(Gibco, Invitrogen Corporation, USA)的 12 孔(孔直径为 75 mm)细胞培养板(Corning Incorporated USA)中,每孔放置 1~3 个鳃瓣,置(25±1)℃生化培养箱中培养。不定期镜检观察寄生虫产卵情况。经过 96 h 孵化培养,将培养液孵化的幼虫用滴管吸出,滴加在 1 000 mL 含有酵母菌、小球藻(10⁵ cfu/L)及少量牛肉膏的培养液中^[13],投放 2~3 尾 1.2 中培养的鱼苗,要求每 300~400 个幼虫投放 1 尾鱼。采取以上方法反复感染 2~3 次,培养 10 d 后随机抽取 1 尾镜检,每个全鳃达到 20 个以上寄生虫时作为保虫寄主。重复上述试验,以获得大量感染寄生虫的寄主备用。

1.5 单殖吸虫对药物敏感性的检测

选择杀灭单殖吸虫效果较好的 2 种药物甲苯咪

唑、吡喹酮,按照文献[7]的方法进行杀虫活性检测,比较不同单殖吸虫对药物的敏感性。试验用水为经充分曝气的自来水(pH 7.0~7.5,溶解氧(OD)>5 mL/L),控制水温(22±1)℃。每组水族箱盛水 200 L。在预试验的基础上,设定的药物浓度在鱼类的安全浓度范围之内,其中甲苯咪唑测试质量浓度梯度为:0.4,0.5,0.6,0.7 和 0.8 mg/L;吡喹酮测试质量浓度梯度为:0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0,2.2 和 2.4 mg/L。每个药物质量浓度梯度投放感染寄生虫鱼 10 尾,48 h 后镜检每尾鱼全鳃寄生虫存活数量,求平均值,同时设空白对照组和溶剂对照组,试验重复 3 次,计算杀虫率。

杀虫率=(空白对照组指环虫平均存活数-试验组指环虫平均存活数)/空白对照组指环虫平均存活数×100%。

1.6 寄主动物的选择

将 1.2 中获得的无虫鱼按每组 100 尾分别养殖在 6 个控温水族箱内。将 1.4 中保种的鱼(欧洲鳗鲡采用从野外采集并除去原虫的鱼)在背鳍打眼标记,再按照与健康鱼 1:5 的比例混养 10 d,在第 10 天,分别剖检被感染的 100 尾鱼和标记的 20 尾鱼全鳃,统计并计算被感染鱼寄生虫感染率、聚集指数,确定易感寄生虫、鱼的种类。

1.7 指环虫保种条件的探究

选择规格较大(金鱼≥6.0 g,鲤、鲢鱼≥10.0 g)、体质较好的感染不同指环虫的鱼,在水族箱中分别于 15,20 和 25℃^[14-15]进行保种养殖,限量投喂饵料,养殖用水为经充分曝气的自来水(pH 7.0~7.5,溶解氧(OD)>5 mL/L),控制水温为(22±1)℃,按照水体 1%~5%加入小球藻、酵母菌、芽孢杆菌混合培养液(10⁹ cfu/mL),充气增氧,每天换水 1/4。养殖 30 d 后各试验组随机抽样 10 尾,镜检统计寄生虫感染率,并统计养殖阶段保虫鱼死亡率。

2 结果与分析

2.1 无虫寄主鱼的获得

表 1 显示,甲苯咪唑在 1.1 mg/L 时能完全杀灭金鱼、鲢鱼和鲤寄生的指环虫,1.5 mg/L 时能够完全杀灭欧洲鳗鲡寄生的拟指环虫;吡喹酮在 2.4 mg/L 时,不能完全杀灭坏鳃指环虫、中型指环虫、鲢指环虫、小鞘指环虫和伸展指环虫,而在 2.2 mg/L 时可以杀灭欧洲鳗鲡寄生的拟指环虫;二硫氰基甲烷在 0.3 mg/L 时,能杀灭所有金鱼、鲢鱼、鲤寄生的车轮虫,在 0.5 mg/L 时能杀灭寄生于欧

洲鳗鲡的车轮虫。

上述结果说明,用 1.1 mg/L 甲苯咪唑和 0.3 mg/L 二硫氰基甲烷对金鱼、鲢鱼、鲤分别药浴 48 h,可以分别获得无虫鱼;分别使用 2.2 mg/L 吡喹酮和 0.5 mg/L 二硫氰基甲烷对欧洲鳗鲡药浴 48 h,可以获得无虫的欧洲鳗鲡。

表 1 甲苯咪唑、吡喹酮和二硫氰基甲烷对指环虫、拟指环虫和车轮虫的杀灭效果

Table 1 Killing effect of mebendazole,praziquantel and dithionitrile methane on *Dactylogyrus*,*Pseudodactylogyrus* and *Trichodina*

寄主 Host	寄生虫种类 Parasite species	寄生虫存活强度 Surviving intensity of Parasite										
		甲苯咪唑/(mg·L ⁻¹) Mebendazole				吡喹酮/(mg·L ⁻¹) Praziquantel				二硫氰基甲烷/(mg·L ⁻¹) Dithiocyanate methane		
		0.9	1.1	1.3	1.5	1.8	2.0	2.2	2.4	0.1	0.3	0.5
金鱼 <i>C. auratus</i>	坏鳃指环虫 <i>D. vastator</i>	+	0	0	0	++	++	++	+			
	中型指环虫 <i>D. intermedius</i>	+	0	0	0	++	++	++	+			
	车轮虫 <i>Trichodina</i>									+	0	0
鲢鱼 <i>H. molitrix</i>	鲢指环虫 <i>D. hypophthalmichthys</i>	0	0	0	0	+++	++	++	++			
	小鞘指环虫 <i>D. vaginulatus</i>	0	0	0	0	++	++	++	+			
	车轮虫 <i>Trichodina</i>									+	0	0
鲤 <i>C. carpio</i>	伸展指环虫 <i>D. extensus</i>	0	0	0	0	+++	++	++	+			
	车轮虫 <i>Trichodina</i>									+	0	0
欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	拟指环虫 <i>Pseudodactylogyrus</i>	++	++	+	0	++	+	0	0			
	车轮虫 <i>Trichodina</i>									++	+	0

注:0 表示全鳃没有存活寄生虫;+表示全鳃存活寄生虫 1~3 个;++表示全鳃存活寄生虫 4~6 个。

Note:0 means no Parasite on the gill;+ means 1-3 Parasites on the gill; ++ means 4-6 Parasites on the gill.

2.2 单殖吸虫的感染率与聚集指数

由表 2 可知,坏鳃指环虫、中型指环虫对金鱼及拟指环虫对欧洲鳗鲡的感染比例最高,感染率均达 100%;其次是小鞘指环虫感染鲢鱼,感染率为 92.4%;再次是伸展指环虫感染鲤,感染率为 83.5%;鲢指环虫感染鲢鱼的比例最低,感染率为

76.1%。自然条件下聚集指数由高到低依次为:拟指环虫>坏鳃指环虫>中型指环虫>小鞘指环虫>鲢指环虫>伸展指环虫。总之,从感染率和聚集指数来看,拟指环虫、中型指环虫和坏鳃指环虫对各自寄主动物的敏感度均较高,可以作为药物筛选时的指示单殖吸虫。

表 2 各种单殖吸虫对寄主鱼的感染率及聚集指数

Table 2 Infection rate and aggregation index of different monogenean to the hosts

寄生虫种类 Parasite species	寄主 Host	平均感染率/% Average infection rate	聚集指数 Index of aggregation
坏鳃指环虫 <i>D. vastator</i>	金鱼 <i>C. auratus</i>	100	15.8
中型指环虫 <i>D. intermedius</i>	金鱼 <i>C. auratus</i>	100	14.2
拟指环虫 <i>Pseudodactylogyrus</i>	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	100	23.9
小鞘指环虫 <i>D. vaginulatus</i>	鲢鱼 <i>H. molitrix</i>	92.4	12.5
伸展指环虫 <i>D. extensus</i>	鲤 <i>C. carpio</i>	83.5	4.3
鲢指环虫 <i>D. hypophthalmichthys</i>	鲢鱼 <i>H. molitrix</i>	76.1	6.7

2.3 药物对单殖吸虫的杀灭效果

甲苯咪唑对单殖吸虫的杀灭结果如图 1 所示。由图 1 可知,在药物浓度相同的情况下,伸展指环虫、坏鳃指环虫、小鞘指环虫和鲢指环虫对甲苯咪唑均较为敏感,其中伸展指环虫 100%被杀灭时的药物质量浓度是 0.6 mg/L,坏鳃指环虫、小鞘指环虫和鲢指环虫 100%被杀灭时的药物质量浓度均为 0.7 mg/L;而中型指环虫和拟指环虫对甲苯咪唑相对不敏感,在试验最高质量浓度 0.8 mg/L 时仍未被完全杀灭,杀灭率分别为 97.0%和 90.5%。

吡喹酮对单殖吸虫的杀灭结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,拟指环虫对吡喹酮最为敏感,杀灭率达 100%的药物质量浓度是 2.2 mg/L;在试验最高质量浓度 2.4 mg/L 时,吡喹酮对中型指环虫、坏鳃指环虫、小鞘指环虫、鲢指环虫和伸展指环虫均未完全杀灭,杀灭率分别为 86.9%,82.7%,81.8%,81.4% 和 56.3%,表明拟指环虫对吡喹酮较其他 5 种指环虫敏感。

上述结果表明,中型指环虫和拟指环虫均可以作为筛选药物的指示单殖吸虫。

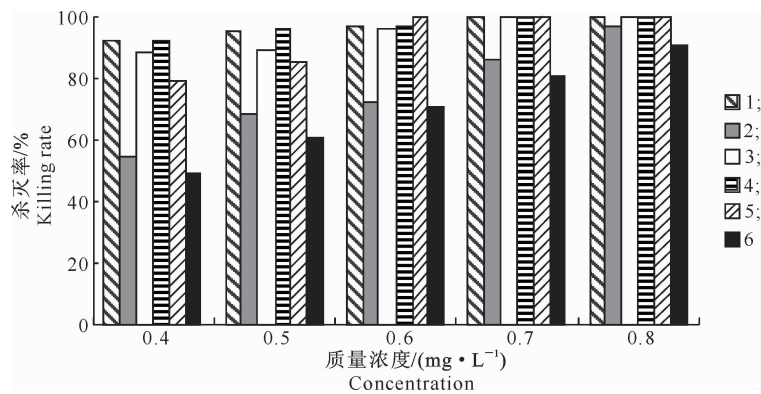


图 1 不同质量浓度甲苯咪唑对 6 种单殖吸虫的杀灭效果

1. 坏鳃指环虫;2. 中型指环虫;3. 鲢指环虫;4. 小鞘指环虫;5. 伸展指环虫;6. 拟指环虫

Fig. 1 Effect of different concentrations of mebendazole against monogenean

1. *D. vastator*;2. *D. intermedius*;3. *D. hypophthalmichthys*;4. *D. vaginulatus*;5. *D. extensus*;6. *Pseudodactylogyrus*

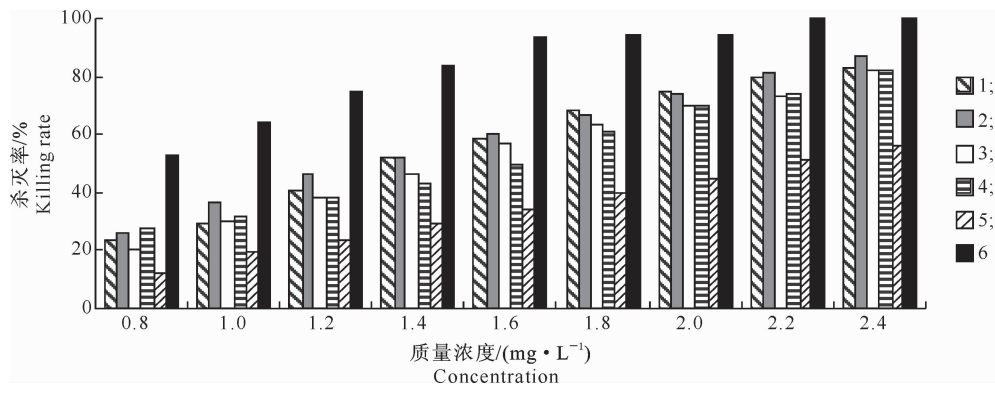


图 2 不同质量浓度吡喹酮对 6 种单殖吸虫的杀灭效果

1. 坏鳃指环虫;2. 中型指环虫;3. 鲢指环虫;4. 小鞘指环虫;5. 伸展指环虫;6. 拟指环虫

Fig. 2 Effect of different doses of praziquantel against monogenean

1. *D. vastator*;2. *D. intermedius*;3. *D. hypophthalmichthys*;4. *D. vaginulatus*;5. *D. extensus*;6. *Pseudodactylogyrus*

2. 4 单殖吸虫对指示寄主的选择

由表 3 可以看出,拟指环虫对欧洲鳗鲡的感染率最高,为 100%,聚集指数为 5.9;其次是中型指环虫对金鱼和小鞘指环虫对鲢鱼的感染率,分别为 97%和 92%,其聚集指数分别为 5.0 和 3.9;其余 3

种指环虫的感染率和聚集指数均较低,从高到低依次为:坏鳃指环虫对金鱼的感染率为 73%,聚集指数为 2.2;伸展指环虫对鲤的感染率为 68%,聚集指数为 1.7;鲢指环虫对鲢鱼的感染率为 65%,聚集指数为 2.4。

表 3 感染 10 d 后 6 种单殖吸虫对相应寄主的感染率和聚集指数

寄主 Host	寄生虫种类 Parasite species	感染率/% Infection rate	聚集指数 Index of aggregation
金鱼 <i>C. auratus</i>	坏鳃指环虫 <i>D. vastator</i>	73	2.2
	中型指环虫 <i>D. intermedius</i>	97	5.0
鲢鱼 <i>H. molitrix</i>	鲢指环虫 <i>D. hypophthalmichthys</i>	65	2.4
	小鞘指环虫 <i>D. vaginulatus</i>	92	3.9
鲤 <i>C. carpio</i>	伸展指环虫 <i>D. extensus</i>	68	1.7
欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	拟指环虫 <i>Pseudodactylogyrus</i>	100	5.9

2. 5 指环虫的保种试验结果

由表 4 可以看出,养殖 30 d 后镜检发现,鱼感染率发生变化,部分鱼出现死亡,水温为 15 ℃时,鱼对 5 种指环虫的感染率均为 0%~70%,死亡率为

5%~20%;水温为 20 ℃时,各种指环虫对受试鱼的感染率均达到 100%,鱼死亡率增加,达 5%~30%;水温为 25 ℃时,各种指环虫对受试鱼的感染率也均达 100%,但鱼死亡率明显增加,为 10%~30%。综

上可知,水温 20 ℃时指环虫的保种效果最好。

表 4 5 种指环虫的保种试验结果

Table 4 Results of conservation test of 5 *Dactylogyrus*

%

寄主 Host	寄生虫种类 Parasite species	15 ℃		20 ℃		25 ℃	
		感染率 Infection rate	鱼死亡率 Morality of fish	感染率 Infection rate	鱼死亡率 Morality of fish	感染率 Infection rate	鱼死亡率 Morality of fish
金鱼 <i>C. auratus</i>	坏鳃指环虫 <i>D. vastator</i>	20~30	5~10	100	10~20	100	10~30
	中型指环虫 <i>D. intermedius</i>	30~50	10~20	100	10~30	100	10~30
鲢鱼 <i>H. molitrix</i>	鲢指环虫 <i>D. hypophthalmichthys</i>	0	5~10	100	10~20	100	10~20
	小鞘指环虫 <i>D. vaginulatus</i>	30~70	5~10	100	20~30	100	20~30
鲤 <i>C. carpio</i>	伸展指环虫 <i>D. extensus</i>	0	5~10	100	5~10	100	10~20

3 讨 论

关于药物对鱼类寄生虫杀灭活性检测方法的研究报道较多^[16-17],对原虫类,如车轮虫、小瓜虫一般多采用离体培养检测杀虫活性方法。但是,前期研究发现,寄生鱼类的单殖吸虫如指环虫很难进行离体培养,指环虫与鳃组织联合培养仅能存活很短时间,因此采用离体培养测定其杀虫活性的误差会比较大,并不能真实反映药物在自然条件下的杀虫效果^[7]。因此,本研究拟建立在活体条件下杀灭鱼类单殖吸虫的药物筛选方法,以更真实地反映某种药物在实际应用中的效果。结果发现,寄生于金鱼的中型指环虫和寄生于欧洲鳊鲮的拟指环虫均对常用杀虫药物相对不敏感且对寄主的感染率较高,感染强度较大,均适合用来筛选杀虫药物,但考虑到欧洲鳊鲮需要从福建等地获得且价格比金鱼高,因此最终选择以中型指环虫为指示单殖吸虫,金鱼为其相应的寄主进行杀灭鱼类单殖吸虫药物的筛选试验。

药敏试验中,寄生在淡水鱼鳃部的指环虫均对甲苯咪唑高度敏感,均能在甲苯咪唑对鱼的安全浓度以下被完全杀灭。但对于欧洲鳊鲮,由于拟指环虫在长期养殖中产生了抗药性,其被 100%杀灭时的甲苯咪唑质量浓度已经接近欧洲鳊鲮中毒浓度,说明甲苯咪唑已不能很好地防治鳊鲮拟指环虫病。有报道指出,吡喹酮对鳊鱼拟指环虫有显著杀灭作用^[18]。本试验中,在吡喹酮质量浓度为 2.4 mg/L 时,仍不能完全杀灭坏鳃指环虫、中型指环虫、鲢指环虫、小鞘指环虫和伸展指环虫等 5 种指环虫,但在 2.2 mg/L 时即可完全杀灭拟指环虫。通过比较甲苯咪唑和吡喹酮 2 种药物对指环虫、拟指环虫的敏感性可知,在今后测定药物杀灭单殖吸虫的效果时,如果试验材料允许,最好同时选择中型指环虫和拟指环虫这 2 类单殖吸虫以确保筛选获得良好的结果。由于试验时设定的药物浓度较低,且进行过预

试验,药物浓度均在鱼类的安全浓度范围之内,所以试验过程中鱼只出现少量死亡。但在实际生产中,由于受到各种外界条件的影响,实际杀虫药物浓度可能会比实验室条件下的大,但是本试验中确定的杀虫药物浓度可以作为实际应用的参考。

从 6 种单殖吸虫活体感染第 10 天的情况可以看出,拟指环虫对欧洲鳊鲮最为敏感,相同条件下的感染率和感染强度均最高,其次是中型指环虫感染金鱼。选择杀灭单殖吸虫的药物时,为了最大限度地体现药物的杀虫效果,试验前的无虫鱼要尽量多地感染相应的寄生虫,才能在试验中体现出药效的差别。所以要选择寄生虫对寄主相对敏感的试验材料,结合感染率和感染强度结果,可以选择拟指环虫寄生的欧洲鳊鲮和中型指环虫寄生的金鱼,如果综合考虑材料的价格、来源和可获得性等因素,则金鱼是较好的试验材料。

本试验还发现,控制水温在 20 ℃是单殖吸虫保种成败和是否感染的关键,水温太高或太低对寄生虫感染率和鱼死亡率均有影响,这与姚卫建等^[19]的研究结果一致。在单殖吸虫保种时,不仅要控制好水温,还要保持水质清新,同时还要在水体中定期投放单胞绿藻类如小球藻、栅藻,而且水体中还应有浓度的硝化细菌、芽孢杆菌等,并使有机质丰富,这样单殖吸虫会大量繁殖,感染率也较高;同时还要注意定期投放一定数量的无虫鱼,以弥补培养过程中的死亡鱼数,达到常年保种的目的。

[参考文献]

[1] Scott M E. Temporal changes in aggregation: A laboratory study [J]. Parasitology, 1987, 94: 583-595.

[2] Kearn G C, Whittington I D. Swimming in a sub-adult monogenean of the genus *Entobdella* [J]. International Journal for Parasitology, 1991, 21(6): 739-741.

[3] Kearn G C. The monogenean skin parasite *Entobdella soleae*: Movement of adults and juveniles from host to host (*Solea solea*) [J]. International Journal for Parasitology, 1988, 18

- (3):313-319.
- [4] Geets A, Coene H, Ollevier F. Ectoparasites of the white spotted rabbitfish, *Siganus sutor* (Valenciennes, 1883, 5) of the Kenyan Coast: Distribution within the host population and site section on the gills [J]. *Parasitology*, 1997, 115: 69-70.
- [5] Simkova A, Yves D, Milan G, et al. Co-existence of nine gill ectoparasites (*Dactylogyrus*; monogenean) parasitizing the roach (*Rutilus rutilus* L.): History and present ecology [J]. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30(10): 1077-1088.
- [6] Lim L H S. Diversity of monogeneans in Southeast Asia [J]. *International Journal for Parasitology*, 1998, 28 (5): 1495-1515.
- [7] 陆宏达, 段求明, 朱光来. 欧洲鳗短钩拟指环虫病及其鳃组织病理 [J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 780-785.
- Lu H D, Duan Q M, Zhu G L. Gill histopathology of European eel (*Anguilla anguilla*) with *Pseudodactylogyrus bini* disease [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 780-785. (in Chinese)
- [8] Wang G X, Jiang D X, Li J, et al. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Parasitol Res*, 2010, 107: 1365-1371.
- [9] Wang G X, Zhou Z, Jiang D X, et al. *In vivo* anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus* [J]. *Vet Parasitol*, 2010, 171(3/4): 305-313.
- [10] Wang G X, Zhou Z, Cheng C, et al. Osthol and isopimpinellin from *Fructus cnidii* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus* [J]. *Vet Parasitol*, 2008, 158(2): 144-151.
- [11] 夏晓勤, 王伟俊, 姚卫建. 小鞘指环虫种群的聚集性研究 [J]. *动物学研究*, 1999, 20(6): 426-430.
- Xia X Q, Wang W J, Yao W J. Study on the aggregation of population of *Dactylogyrus vaginulatus* [J]. *Zoological Research*, 1999, 20(6): 426-430. (in Chinese)
- [12] 姚卫建. 红鳍原鲃鳃部寄生单殖吸虫生态位分析 [J]. *生态学杂志*, 2001, 20(4): 70-71.
- Yao W J. Niche analysis of monogenean parasitized on the gills of *Cultrichthys erythropterus* [J]. *Journal of Ecology*, 2001, 20(4): 70-71. (in Chinese)
- [13] 王高学, 徐 钰, 王建华. 29 种天然植物提取物对指环虫杀灭作用的研究 [J]. *淡水渔业*, 2006, 36(3): 3-8.
- Wang G X, Xu Y, Wang J H. Study on the killing of 29 plants extractions to the *Dactylogyrus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(3): 3-8. (in Chinese)
- [14] 刘继芳, 杨廷宝, 李建军. 单殖吸虫的生态学 [J]. *生态科学*, 2002, 22(2): 164-169.
- Liu J F, Yang T B, Li J J. Ecology of monogenea [J]. *Ecological Science*, 2002, 22(2): 164-169. (in Chinese)
- [15] 夏晓勤, 王伟俊. 单殖吸虫生物学及生态学 [J]. *水生生物学报*, 1997, 21(1): 75-84.
- Xia X Q, Wang W J. Biology and ecology of monogenea [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(1): 75-84. (in Chinese)
- [16] Hirazawa N, Ohtaka T, Hata K. Challenge trials on the ant-helmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes* [J]. *Aquaculture*, 2000, 188: 1-13.
- [17] Hirazawa N, Oshima S I, Hata K. *In vitro* assessment of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites [J]. *Aquaculture*, 2001, 200: 251-258.
- [18] Schliffka W. Praziquantel in therapy of the European eel infested by *Dactylogyrus* [C]//Deutsche-Veterinaermedizinische-Gesellschaft. V. -DVG-, -Tagungsberichte. Germany, F. R. : Bonn Univ, 1987: 98-101.
- [19] 姚卫建, 聂 品. 鲢和草鱼鳃部寄生单殖吸虫的种群分布和季节动态 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28(6): 664-667.
- Yao W J, Nie P. The distribution of population and seasonal dynamics of monogenea parasitized to the gills of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6): 664-667. (in Chinese)