

# 15种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*) 的杀灭效果及包囊破裂的条件\*

刘婷婷 唐小千 周丽<sup>①</sup>

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要** 比较分析了15种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)滋养体和幼虫的离体杀灭效果,并探讨了刺激隐核虫包囊破裂产生幼虫的最适温度和盐度条件。结果显示,中草药药物浓度为4.55 g/L时,槟榔对滋养体和幼虫有杀灭效果,大黄和野菊花仅对幼虫有杀灭效果;药物浓度为9.09 g/L时,苦参、贯众对滋养体和幼虫具有杀灭效果。药物浓度为18.18 g/L时,黄芩、川楝子、枳壳对滋养体和幼虫都具有杀灭效果。野菊花对滋养体也具有杀灭效果;在45.45、90.09 g/L较高药物浓度时,黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄对幼虫和滋养体具有杀灭效果。研究表明,槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、枳壳、川楝子、野菊花杀虫效果显著;黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄、黄连的杀虫效果不显著。不同培养温度和盐度对刺激隐核虫包囊破裂产出幼虫所需时间比较结果显示,包囊破裂产出幼虫的最适温度为26℃、最适盐度为20–30。

**关键词** 中草药; 刺激隐核虫; 滋养体; 幼虫; 包囊; 温度; 盐度

**中图分类号** S941.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0113-08

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)又称海水小瓜虫,属于纤毛门、前口纲、前管目、隐核虫科、隐核虫属(*Cryptocaryon*)(Diggles *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2002)。球形或卵圆形,全身表面披有均匀一致的纤毛,个体大小(34–66) μm×(360–500) μm,做缓慢旋转运动。生活史分为滋养体、包囊前体、包囊和幼虫4个阶段。刺激隐核虫不能离体培养,只能在鱼体上进行传代培养(Dan *et al.*, 2006)。刺激隐核虫感染海水鱼类会造成病鱼活动异常、呼吸困难以及由于机械损伤引起的继发性细菌感染(刘振勇等, 2012),严重感染可导致鱼类大量死亡。

海水鱼类养殖过程中主要采用化学药物杀灭刺激隐核虫,防治“白点病”。通常使用高锰酸钾、福尔马林、铜离子类药物以及染料类药物吡啶黄、亚甲基等化学药物(黄玮等, 2005)。化学药物对养殖鱼类和环境都有一定的危害性,如甲醛的使用浓度常在200–1000 ml/m<sup>3</sup>,不但不能彻底杀灭刺激隐核虫,而

且可以引起鱼类厌食或组织损伤,给更多的敌害生物可乘之机,加重病情(王印庚等, 2011)。此外刺激隐核虫对药物极易产生抗性,同时具有造成食品安全、环境污染的隐患(王大鹏等, 2013)。因此探讨环境友好、安全有效又能杀灭虫体的中草药对防治海水鱼类“白点病”具有参考价值。已有研究发现槟榔、苦参、苦楝3种中草药配伍,熬成药汤,全池泼洒,经过处理之后,红鳍东方鲀体表小白点消失,鱼体恢复正常,治愈率可达90%以上(陈章群, 2005)。

本研究试验了槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、野菊花等15种中草药对刺激隐核虫滋养体和幼虫离体杀灭效果,并分析了刺激隐核虫包囊脱包、产生幼虫的最适温度和盐度条件。旨在筛选对刺激隐核虫具有杀灭效果的中草药,了解刺激隐核虫包囊脱包、产出幼虫的环境条件,为进一步研究海水鱼类“白点病”的防治技术提供参考。

\* 国家科技支撑计划(2012BAD17B01)资助。刘婷婷, E-mail: tliu901024@163.com

① 通讯作者: 周丽, 教授, E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-01-05, 收修改稿日期: 2015-04-06

## 1 材料与方 法

### 1.1 刺激隐核虫滋养体的收集、包囊和幼虫的培养以及形态学观察

病鱼为取自中国海洋大学太平角试验基地暂养的红鳍东方鲀(体重 450–500 g)。将病鱼麻醉致死,用载玻片从鱼体上刮取黏液置于盛有过滤海水的培养皿中,黏液中含有大量刺激隐核虫滋养体。用 1 ml 移液枪吸取虫体置于另一洁净平皿中,用过滤海水反复洗涤。将洗涤干净的滋养体分成两部分,一部分滋养体用于中草药杀灭实验,另一部分滋养体放置在室温下(22℃左右)静置 5–8 h,使其形成包囊。由于滋养

体离体后极易形成包囊,将滋养体放置在室温下(22℃左右)静置观察后发现 5–8 h 后包囊才形成,因此用于中草药杀灭实验的滋养体于室温下(22℃左右)观察 4 h 不会形成包囊。将形成的包囊置于 26℃恒温培养箱,培养 72–84 h 至包囊破裂,待幼虫大量孵化产出,离心(800×g, 10 min)收集幼虫,用过滤煮沸海水调整幼虫浓度至 100 个/ml,用于检测中草药对幼虫的杀灭效果。Olympus1×71 倒置显微镜观察刺激隐核虫生活史各期虫体外观形态。

### 1.2 实验用中草药

用于实验的中草药如表 1 所示。

表 1 实验用中草药名录  
Tab.1 List of the tested Chinese herbal medicines

| 科名<br>Family name       | 中草药名<br>Name of Chinese herbal<br>medicine | 主要功效 Main function   |
|-------------------------|--|--|
| 唇形科<br>Labiatae         | 黄芩<br><i>Scutellaria baicalensis</i>       | 泻火解毒, 抗菌、抗病毒<br>Purging fire and detoxification, Antibacterial, Antiviral              |
| 蓼科<br>Polygonaceae      | 大黄<br><i>Rheum officinale</i>              | 清热燥湿、泻火、解毒<br>Heat-clearing dampness-drying, Purging fire and detoxification           |
| 楝科<br>Meliaceae         | 川楝子<br><i>Melia toosendan</i>              | 止痛、驱虫<br>Pain, Insect repellent  |
| 豆科<br>Leguminosae       | 苦参<br><i>Sophora flavescens</i>            | 清热燥湿、杀虫<br>Heat-clearing dampness-drying, Kill insects                                 |
| 豆科<br>Leguminosae       | 黄芪<br><i>Astragalus membranaceus</i>       | 固表、生肌、利水退肿<br>Strengthening superficies, Promoting granulation, Detumescence           |
| 棕榈科<br>Palmaceae        | 槟榔<br><i>Areca catechu</i>                 | 消积、化痰、疗疟、杀虫<br>Removing food retention, Reduce phlegm, Malaria shot, Kill insects      |
| 菊科<br>Compositae        | 野菊花<br><i>Dendranthema indicum</i>         | 消肿、抗菌、抗病毒<br>Detumescence, Antibacterial, Antiviral                                    |
| 芸香科<br>Rutaceae         | 枳壳<br><i>Citrus aurantium</i>              | 行痰、消积<br>Reduce phlegm, Removing food retention  |
| 玄参科<br>Scrophulariaceae | 熟地黄<br><i>Rehmannia glutinosa</i>          | 安神补血、提高免疫力<br>Calm the nerves and enrich the blood, Immunity enhancement               |
| 毛茛科<br>Ranunculaceae    | 白头翁<br><i>Anemone chinensis</i>            | 清热燥湿、抗菌、解毒<br>Heat-clearing dampness-drying, Antibacterial and detoxification          |
| 三白草科<br>Saururaceae     | 鱼腥草<br><i>Houttuynia cordata</i>           | 抗菌、抗病毒、提高机体免疫力<br>Antibacterial, Antiviral, Immunity enhancement                       |
| 毛茛科<br>Ranunculaceae    | 黄连<br><i>Coptis chinensis</i>              | 泻火解毒、抗菌、抗病毒<br>Purging fire and detoxification, Antibacterial, Antiviral               |
| 忍冬科<br>Caprifoliaceae   | 金银花<br><i>Lonicera japonica</i>            | 清热解毒、抗菌、增强免疫力<br>Heat-clearing and detoxification, Antibacterial, Immunity enhancement |
| 十字花科<br>Cruciferae      | 板蓝根<br><i>Isatis tinctoria</i>             | 清热解毒、抑菌<br>Heat-clearing and detoxification, Antibacterial                             |
| 鳞毛蕨科<br>Dryopteridaceae | 贯众<br><i>Cyrtomium rhizoma</i>             | 清热解毒, 止血, 杀虫<br>Heat-clearing and detoxification, Hemostasis, Kill insects             |

### 1.3 中草药药液制备

15 种中草药粉碎后, 各取 20 g 用 500 ml 海水浸泡 30 min 后煎煮 2 h, 纱布过滤浓缩药液至 200 ml, 其终浓度相当于原药 100 g/L(鉏超等, 2010)。分别将原药液稀释成 50、20、10、5 g/L 4 种不同的浓度, 每种浓度的中草药药液配制 10 ml 用于实验。

### 1.4 中草药杀灭滋养体、幼虫

**1.4.1 滋养体** 移液枪吸取虫体放入 24 孔板中, 每孔中大约有 15–20 个虫体, 体积 100  $\mu$ l。分别加入 100、50、20、10、5 g/L 5 种不同浓度的中草药 1 ml, 每一药物浓度做 3 组平行, 对照组加入等体积的过滤灭菌海水, 在室温下(22 $^{\circ}$ C左右)分别于 10、30、60、120、240 min 镜检观察滋养体死亡情况, 记录全部虫体死亡所需时间。数据用 Microsoft Excel 软件分析处理, 用于杀灭滋养体的中草药的最终浓度计算采用: 药液浓度 $\times$ 1 ml/1.1 ml; 刺激隐核虫滋养体全部死亡时间计算采用平均值 $\pm$ 标准差。

**1.4.2 幼虫** 移液枪吸取混匀幼虫(约 100 个/ml) 100  $\mu$ l, 放入 24 孔板中, 分别加入 100、50、20、10、5 g/L 5 种不同浓度的中草药 1 ml, 每一个处理做 3 组平行, 对照组加入等体积的过滤灭菌海水, 在室温下(22 $^{\circ}$ C左右)分别于 10、30、60、120、240 min 镜检观察幼虫死亡情况, 记录全部虫体死亡所需时间。数据处理同 1.4.1。

### 1.5 温度和盐度对包裹破裂、幼虫脱包产出的影响

吸取 2 ml 盐度为 30 的过滤海水, 依次置于 6 孔板中, 吸取一定量(约 10 个)滋养体放入 6 孔板中, 处理做 3 组平行; 分别将 6 孔板放置于 15、21、26、31、37 $^{\circ}$ C 恒温箱中, 每隔 12 h, 镜检观察虫体分裂、脱包情况, 记录幼虫产出所需时间。

用海水晶将海水盐度分别调成 15、20、25、30、35、40, 6 个梯度, 吸取 2 ml 不同盐度的海水依次置于 6 孔板中, 吸取一定量(约 10 个)滋养体放入 6 孔板中, 每一个处理做 3 组平行; 分别将这 6 个盐度梯度的 6 孔板放置于 26 $^{\circ}$ C 恒温箱中, 每隔 12 h, 镜检观察虫体分裂、脱包情况, 记录幼虫产出所需时间。

## 2 结果

### 2.1 症状及虫体形态

患病鱼体色暗淡无光, 浮于水面缓慢游动。体表、鳍、鳃等处肉眼可见小白点。鱼体表黏液增多, 腹部皮肤点状充血, 感染严重的鱼体表发炎溃疡, 鳍条缺

损、开叉, 眼睛白浊, 鳃丝褪色腐烂, 伴有继发细菌感染病症(图 1-a)。刮取体表黏液或剪取鳃组织, 倒置显微镜下观察, 可见滋养体呈圆形或梨形, 在所寄生组织处缓慢旋转(图 1-b), 部分滋养体可观察到 U 形排列的大核(图 1-c), 离体后的滋养体逐渐变圆形成包裹(图 1-d)。分别观察并测量了 20 个滋养体、包裹和幼虫的大小, 发现滋养体与包裹大小相似, 约为 200–500  $\mu$ m, 幼虫大小为 30–50  $\mu$ m(图 2)。

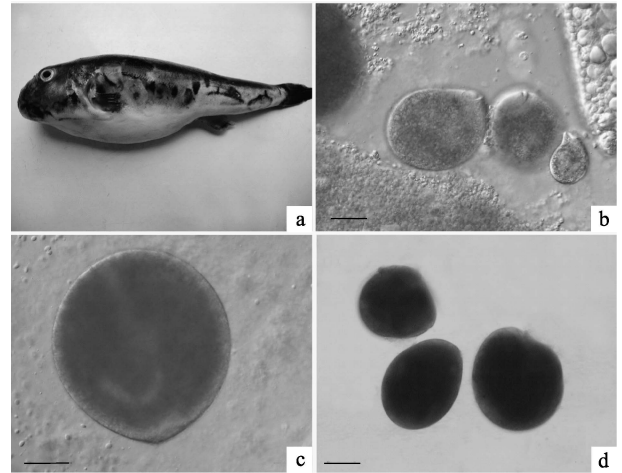


图 1 病鱼外观症状及滋养体离体前后的形态  
Fig.1 Symptoms of infected fish and morphologies of trophonts in the gill and *in vitro*

a: 患病红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*); b: 鳃组织上的滋养体;  
c: 滋养体 U 型大核; d: 离体后的滋养体形态(标尺=100  $\mu$ m)  
a: diseasial *T.rubripes*  
b: The trophonts in the gill; c: The U macronucleus;  
d: The morphology of trophonts *in vitro* (bar=100  $\mu$ m)

### 2.2 中草药对滋养体的杀灭效果

从 15 种中草药对刺激隐核虫滋养体的杀灭效果(表 2)可以看出, 药物浓度为 4.55 g/L 时, 槟榔对滋养体有明显的杀灭作用, 滋养体在 110 min 时间内全部破裂死亡(图 3)。药物浓度为 9.09 g/L 时, 大黄、苦参、黄连、贯众在 150 min 内均能杀灭滋养体, 杀灭强度由强到弱依次为苦参、大黄、黄连、贯众。药物浓度为 18.18 g/L 时, 黄芩、川楝子、野菊花、枳壳在 120 min 内均能杀灭滋养体, 杀灭强度由强到弱依次为黄芩、枳壳、川楝子、野菊花。药物浓度为 45.45 g/L 时, 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花在 183 min 内能杀灭滋养体。药物浓度为 90.91 g/L 时, 熟地黄对滋养体具有杀灭作用, 时间为 5 min 左右。比较分析可以看出, 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄只有药物浓度在 45.45 g/L 或以上时对滋养体才具有杀灭作用, 与同浓度的其他中草药相比, 杀灭

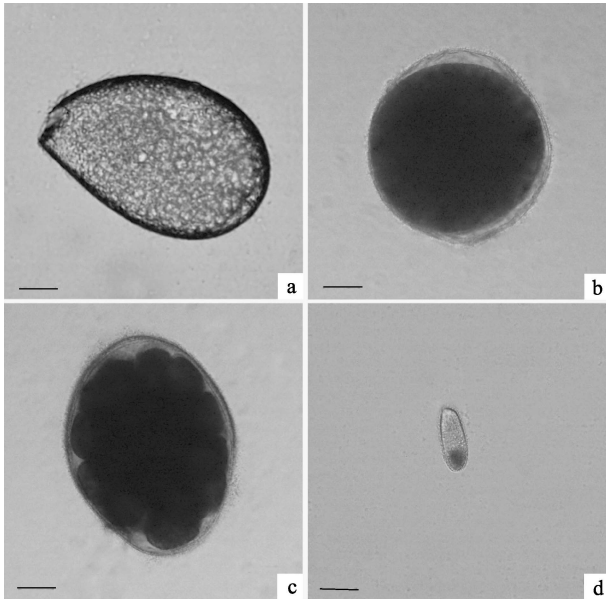


图2 刺激隐核虫生活史中各期虫体外观形态  
Fig.2 The morphology of *Cryptocaryon irritans* in each phase of its life cycle

a: 滋养体; b: 包囊前体; c: 包囊; d: 幼虫  
(10×20)(标尺=50 μm)

a: Trophonts; b: Protomonts; c: Tomonts; d: Theronts  
(10×20)(bar=50 μm)

滋养体所需时间更长,证明黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄的杀灭效果不显著。黄连虽然在药物浓度为 9.09 g/L 时就有杀灭效果,但所用时间较长(148 min),并且在 45.45 g/L 浓度时,杀灭时间为 75 min,而对滋养体杀灭效果较好的中草药如槟

榔、大黄、苦参、黄芩、川楝子在相同浓度下仅需 1–10 min 即可杀死滋养体,说明黄连虽有杀虫效果但杀灭时间较长,对滋养体的杀灭效果不理想。实验得出,槟榔、苦参、大黄、贯众 4 种中草药杀灭滋养体效果较好;黄芩、枳壳、川楝子、野菊花 4 种中草药的杀灭效果一般;黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄、黄连 7 种中草药杀灭滋养体效果不显著。对照组滋养体在 4 h 内没有死亡,并进一步形成包囊,在 26℃ 恒温箱培养后,释放出大量具有感染性的幼虫。(表 2 中的数据用 Microsoft Excel 软件分析处理,计算采用:平均值±标准差)。

### 2.3 中草药对幼虫杀灭效果

如表 3 所示,中草药药物浓度为 4.55–9.09 g/L 时,槟榔、苦参、大黄、贯众、野菊花对幼虫有明显的杀灭作用,镜下观察,滴加药物后,幼虫游动逐渐缓慢,60 min 内全部停止游动死亡。药物浓度为 18.18 g/L 时,黄芩、川楝子、枳壳在 60 min 内均能杀灭幼虫。药物浓度为 45.45 g/L 时,黄芪、熟地黄、白头翁、黄连在 12 min 内能杀灭幼虫。药物浓度为 90.91 g/L 时,鱼腥草、板蓝根对幼虫具有杀灭作用,时间为 1 min 左右。结果显示,槟榔、苦参、大黄、贯众、野菊花、黄芩、川楝子、枳壳、金银花杀虫效果显著。黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、熟地黄、黄连只有在高浓度 45.45–90.91 g/L 时才有效,其他较低浓度均没有效果,因此杀虫效果不显著。对照组幼虫在 1 h 内没有死亡。(表 3 中的数据用 Microsoft Excel

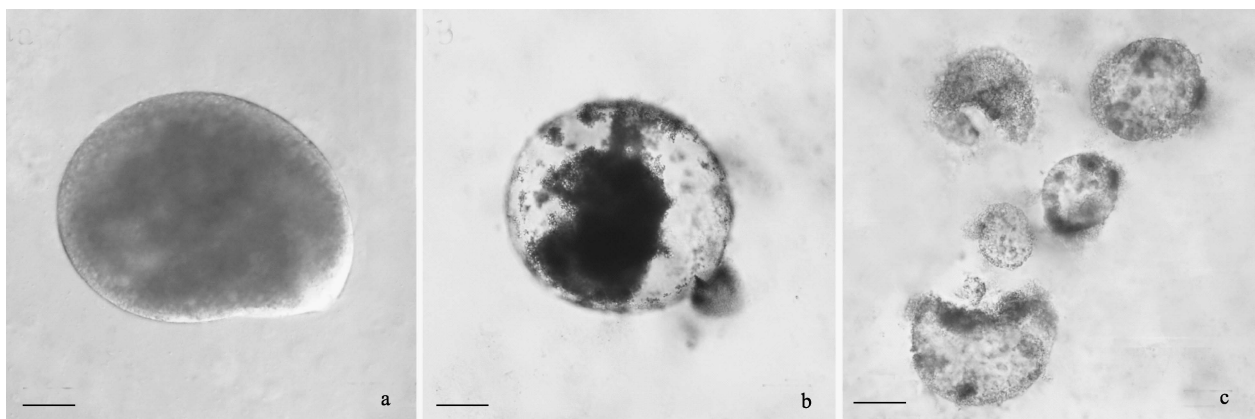


图3 中草药杀灭前后滋养体的形态变化

Fig.3 The morphological changes of trophonts before and after the Chinese herbal medicine treatment

a: 用药前正常的滋养体; b: 用药后刚解体死亡的滋养体

c: 用药后最终解体死亡的滋养体 显微镜观察(10×20) (标尺=50 μm)

a: Trophonts before Chinese herbal medicine treatment; b: Immediately dead trophonts after Chinese herbal medicine treatment; c: Dead trophonts after Chinese herbal medicine treatment. The three figures were all microscope observation (10×20)(bar=50 μm)

表 2 15 种中草药杀灭刺激隐核虫滋养体效果  
Tab.2 The killing effects of Chinese herbal medicine on *C. irritans* trophonts *in vitro*

| 药名<br>Name of Chinese herbal<br>medicine | 浓度 Concentration   |            |             |            |            |
|--|--|------------|-------------|------------|------------|
|  | 90.91 g/L  | 45.45 g/L  | 18.18 g/L   | 9.09 g/L   | 4.55 g/L   |
|  | 刺激隐核虫滋养体全部死亡时间(min) Trophonts of <i>C. irritans</i> all of the time of death |            |             |            |            |
| 黄 芩 <i>S. baicalensis</i>                | 1.0±0.0  | 8.0±1.0    | 40.0±5.0    | —          | —          |
| 大 黄 <i>R. officinale</i>                 | 1.0±0.0  | 1.0±0.0    | 5.0±1.0     | 144.0±10.0 | —          |
| 川 楝 子 <i>M. toosendan</i>                | 1.0±0.0  | 1.0±0.33   | 119.0±5.0   | —          | —          |
| 苦 参 <i>S. flavescens</i>                 | 1.0±0.0  | 2.0±0.38   | 21.0±5.0    | 41.0±2.0   | —          |
| 黄 芪 <i>A. membranaceus</i>               | 1.0±0.0  | 183.0±10.0 | —           | —          | —          |
| 槟 榔 <i>A. catechu</i>                    | 1.0±0.0  | 1.0±0.0    | 12.0±2.0    | 90.0±5.0   | 110.0±10.0 |
| 野菊花 <i>D. indicum</i>                    | 1.0±0.0  | 20.29±5.0  | 120.72±10.0 | —          | —          |
| 枳 壳 <i>C. aurantium</i>                  | 1.0±0.0  | 9.0±1.0    | 52.0±10.0   | —          | —          |
| 熟地黄 <i>R. glutinosa</i>                  | 5.35±2.0   | —          | —           | —          | —          |
| 白头翁 <i>A. chinensis</i>                  | 1.0±0.0  | 36.26±6.0  | —           | —          | —          |
| 鱼腥草 <i>H. cordata</i>                    | 47.53±5.0  | 119.43±9.6 | —           | —          | —          |
| 黄 连 <i>C. chinens</i>                    | 1.0±0.0  | 75.0±11.0  | 106.32±10.0 | 148.0±15.0 | —          |
| 金银花 <i>L. japonica</i>                   | 1.0±0.0  | 41.0±5.0   | —           | —          | —          |
| 板蓝根 <i>I. tinctoria</i>                  | 1.0±0.0  | 182.0±15.0 | —           | —          | —          |
| 贯 众 <i>C. Rhizoma</i>                    | 1.0±0.0  | 1.0±0.0    | 80.0±3.0    | 180.0±7.0  | —          |
| 对 照 Contrast                             | —  | —          | —           | —          | —          |

“—”表示滋养体在药物处理 4 h 后仍然存活, 判定药物无效

“—” means that medicine is invalid when trophont is still alive after 4 h of medicine treatment

表 3 15 种中草药杀灭刺激隐核虫幼虫效果  
Tab.3 The killing effects of Chinese herbal medicine on *C. irritans* theronts *in vitro*

| 药名<br>Name of Chinese herbal medicine | 浓度 Concentration   |           |             |           |           |
|---------------------------------------|--|-----------|-------------|-----------|-----------|
|                                       | 90.91 g/L  | 45.45 g/L | 18.18 g/L   | 9.09 g/L  | 4.55 g/L  |
|                                       | 刺激隐核虫幼虫全部死亡时间(min) Theronts of <i>C. irritans</i> all of the time of death |           |             |           |           |
| 黄 芩 <i>S. baicalensis</i>             | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 12.41±1.9   | —         | —         |
| 大 黄 <i>R. officinale</i>              | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 5.50±1.3    | 17.0±3.0  | 37.2±1.21 |
| 川 楝 子 <i>M. toosendan</i>             | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 1.0±0.0     | —         | —         |
| 苦 参 <i>S. flavescens</i>              | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 22.0±1.3    | 37.23±2.5 | —         |
| 黄 芪 <i>A. membranaceus</i>            | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 200.41±10.0 | —         | —         |
| 槟 榔 <i>A. catechu</i>                 | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 1.0±0.0     | 5.0±1.0   | 8.21±0.9  |
| 野菊花 <i>D. indicum</i>                 | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 37.54±2.3   | 53.03±4.0 | 58.09±6.8 |
| 枳 壳 <i>C. aurantium</i>               | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 1.0±0.0     | —         | —         |
| 熟地黄 <i>R. glutinosa</i>               | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | —           | —         | —         |
| 白头翁 <i>A. chinensis</i>               | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 81.74±10.4  | —         | —         |
| 鱼腥草 <i>H. cordata</i>                 | 1.0±0.0  | —         | —           | —         | —         |
| 黄 连 <i>C. chinens</i>                 | 1.0±0.0  | 11.52±2.5 | 84.00±11.5  | —         | —         |
| 金银花 <i>L. japonica</i>                | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 5.32±2.2    | —         | —         |
| 板蓝根 <i>I. tinctoria</i>               | 1.0±0.0  | —         | —           | —         | —         |
| 贯 众 <i>C. Rhizoma</i>                 | 1.0±0.0  | 1.0±0.0   | 15.17±2.0   | 35.41±5.0 | —         |
| 对 照 Contrast                          | —  | —         | —           | —         | —         |

“—”表示滋养体在药物处理 4 h 后仍然活着, 判定药物无效

“—” means that medicine is invalid when theronts is still alive after 4 h of medicine treatment

软件分析处理, 计算采用: 平均值±标准差)

#### 2.4 温度、盐度对包囊破裂幼虫产出的影响

在正常海水盐度(30)下, 温度设为 15、21、26、31、37℃, 5 个梯度培养包囊, 连续 6 d 观察包囊破裂情况(图 4)。在 26、31℃, 包囊从 60 h 开始破裂, 其中温度为 26℃时, 包囊在 84 h 全部破裂, 产出幼虫游动快速, 活力好; 温度为 31℃时, 包囊在 84 h 达到 80% 破裂, 此后包囊停止破裂。产出的幼虫游动缓慢, 活力较弱。温度为 15、21℃时, 包囊从 96 h 开始破裂且始终未达到 100% 破裂。37℃下培养的包囊实验期间始终没有破裂。结果显示, 26℃是包囊破裂的适宜温度。

在温度为 26℃, 盐度设为 15、20、25、30、35、40, 6 个梯度培养包囊, 观察包囊破裂情况(图 5)。盐度为 20、25、30、35, 包囊从 72 h 开始破裂, 破裂率依次为 33%、25%、25%、17%。其中, 盐度为 20、25、30, 包囊在 84 h 达到 100% 破裂。盐度为 15, 包囊在

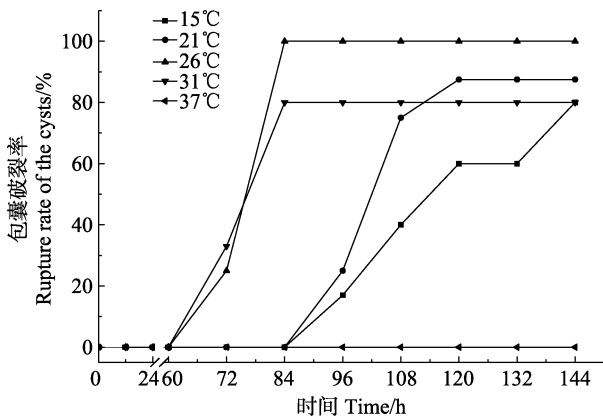


图 4 不同温度条件下包囊破裂情况

Fig.4 Results of the cysts rupture at different temperatures

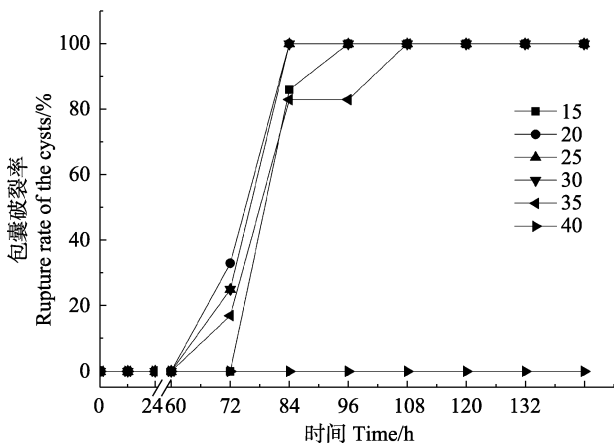


图 5 不同盐度条件下包囊破裂情况

Fig.5 Results of the cysts rupture at different salinities

84 h 开始破裂, 96 h 达到 100% 破裂。盐度为 35, 包囊在 108 h 达到 100% 破裂。盐度为 40, 包囊始终未破裂。盐度为 15 的包囊虽能达到 100% 破裂但开始破裂所需时间较长, 盐度为 15 包囊虽开始破裂所需时间与盐度 20、25、30 相同, 但达到 100% 破裂所需时间较长, 因此认为包囊破裂的适宜盐度为 20–30 之间。

### 3 讨论

中草药毒副作用小, 制剂使用安全, 容易分解, 不会在鱼体中形成药残, 不会对环境造成污染, 国内应用中草药防治鱼病越来越被重视(刘海侠等, 2006; 胡梁及等, 2014; 曹红峰等, 2006)。本研究发现槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、野菊花等中草药对刺激隐核虫具有杀灭效果且杀灭强度与药物浓度呈正相关, 浓度范围为 4.55–90.91 g/h 时, 浓度越高, 则杀灭强度越大。据报道, 槟榔对多子小瓜虫游离滋养体具有杀灭和抑制作用, 最适药物浓度为 100–300 mg/L, 理想浓度为 150–200 mg/L(陈熙春, 2004), 本研究证明槟榔在药物浓度为 4.55 g/L 时, 可杀灭滋养体和幼虫。本研究表明, 相比较其他 14 种中草药, 槟榔对刺激隐核虫杀灭效果非常明显, 可以考虑作为防治刺激隐核虫病的首选中草药。

药理学研究表明, 大黄、野菊花在抑制鱼类病原微生物上有独特的功效。从 116 种中草药中筛选出大黄对粘细菌有抑制作用, 并进行了有效成分的提取和试验, 证实大黄中的含酚基有机酸类可抑制粘细菌体内的脱氢酶系的活性, 从而阻碍了该菌的正常生物氧化过程(中国水产学会鱼病研究会, 1990)。张海宾等(2003)测定 10 种中草药沸水提取物的抗菌活性和最低抑菌浓度, 表明大黄、野菊花抑菌效果好。本研究发现, 大黄和野菊花在 4.55 g/L 浓度下 1 h 内杀灭幼虫, 可以在一定程度上阻断刺激隐核虫的生活史, 说明大黄和野菊花对杀灭刺激隐核虫有一定药用价值。

本研究发现, 在药物浓度 9.09 g/L 时, 苦参、贯众对刺激隐核虫滋养体具有杀灭作用, 槟榔、大黄、野菊花对幼虫的杀灭作用更进一步, 杀灭时间缩短, 药效更强。据研究报道, 中草药成分中的生物碱如苦参碱作用于寄生虫的中枢神经系统, 使之兴奋产生惊厥, 进而作用于呼吸及神经系统, 使寄生虫死于呼吸抑制。张继平等(2005)研究表明, 苦参碱对鱼类鳃寄生的车轮虫起到有效驱杀作用。黄芩中含有黄酮类化合物, 通过破坏细胞膜的完整性, 导致膜电子传递、营养吸收、核苷酸合成及 ATP 活性等功能障碍, 从而起到抑菌杀虫的作用(谢鹏等, 2005)。日本学者

Tsuyoshi 等(2014)研究发现,可在真鲷上使用苦参杀灭刺激隐核虫。将药物浓度为 10 g/kg 的提取物放入鱼食中口服 7 d,可以减少 40%鱼体上的滋养体且对鱼体安全,苦参提取物在鱼体上起到的杀灭刺激隐核虫滋养体的效果和离体杀灭效果一致,证明了离体杀灭刺激隐核虫具有有效性和实用性,可以参考使用到临床实践中。本研究所得的药效结果都是基于离体杀虫试验,发现槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、枳壳、川楝子、野菊花 8 种中草药具有较好的杀虫效果,可以参考使用到养殖鱼类刺激隐核虫病的防治中。

包囊由于其外面是一层较厚的包囊壁,药物很难进入,难以杀灭。从其分裂产出幼虫的温度、盐度等环境条件入手,了解包囊破包产出幼虫的最适环境条件,从而调节养殖环境条件,减缓包囊破裂的时间或者在包囊破裂产出幼虫的第一时间用药将幼虫杀灭,防止幼虫侵染鱼类而导致白点病的发生。因此本研究进行了包囊破裂产生幼虫最适温度、盐度条件的研究。

本研究证明包囊破裂百分比与温度呈正相关,温度越高则包囊破裂的时间越早,但在 37℃下,没有包囊破裂现象。Cheung 等(1979)报道,在 7℃低温和 37℃高温下,刺激隐核虫包囊不发生破裂现象,证明在相对低温和高温情况中,包囊都不能产生破裂,包囊破裂的最适温度为 30℃。Dan 等(2009)研究发现,刺激隐核虫包囊在 12℃的条件下可以保存 4-5 个月之久。当保存的包囊再次放到常温下可以孵化出大量幼虫,幼虫依然具有感染性,低温处理对防治刺激隐核虫病的暴发,效果不显著。但学明(2006)<sup>1)</sup>试验结果显示,培育温度维持在 20-30℃之间,刺激隐核虫包囊破裂率能达到 90%以上。温度越高,虫体发育速度越快,包囊破裂时间越集中。在 27℃时,包囊破裂集中在 2 d 内完成,而在 20℃时,需延续到 5 d 才完全破裂,所以认为包囊破裂的最适温度为 27℃。这与本实验得出的刺激隐核虫包囊破裂的最适温度为 26℃基本一致。

本研究通过盐度对包囊破裂的影响发现,20-30 盐度范围内,包囊的破裂率和破裂时间无显著性差异。认为包囊破裂的盐度适应范围较广,20-30 盐度范围内均适合包囊破裂。40 高盐度下无包囊破裂现象,15 低盐度下包囊破裂所需时间长,大约需要 4 d 的时间,故较高盐度和较低盐度条件均不适合包囊破裂产出幼虫。Cheung 等(1979)证明在盐度为 16 或者更低时,刺激隐核虫包囊不能正常发育破裂。Colorni 等

(1985)报道,将被刺激隐核虫侵染的金头鲷置于盐度为 45-60 的盐水中处理 5-20 min,鱼体上 45%-50%的滋养体可被杀死。因此,在海水鱼类刺激隐核虫病暴发的春秋季节,如能适当调节养殖海水的盐度,在一定程度上可阻止刺激隐核虫病的大规模发生。

## 参 考 文 献

- 王大鹏,何安尤,谢达祥,等. 龙胆石斑刺激隐核虫病防治技术研究. 水产科技情报, 2013, 40(1): 22-26
- 王印庚,刘志伟,林春媛,等. 养殖大菱鲆刺激隐核虫病及其治疗. 水产学报, 2011, 35(7): 1105-1112
- 中国水产学会鱼病研究会. 我国水产药的发展现状、存在问题及国外的研究概况. 鱼类病害研究, 1990, 12(4): 3-10
- 刘振勇,林小金,谢友佳,等. 大黄鱼刺激隐核虫病继发细菌感染致死原因的研究. 福建水产, 2012, 34(1): 11-15
- 刘海侠,于三科. 我国鱼类寄生虫病现状及防治对策. 动物医学进展, 2006, 27(5): 103-105
- 张海宾,张书霞. 温和气单胞菌对 10 种中草药耐药性的初步研究. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2003, 16(1): 39-41
- 张继平,贺顺连,胡卫平. 苦参不同方法提取物抗鱼体车轮虫作用的研究. 长江大学学报(自然科学版), 2005, 2(2): 57-59
- 陈章群. 中草药防治红鳍东方鲀刺激隐核虫病. 水产养殖, 2005, 26(4): 40
- 陈熙春. 槟榔防治小瓜虫初报. 科学养鱼, 2006, (1): 52
- 胡梁及,朱盛山,张雄飞,等. 中草药防治寄生性鱼病的研究进展. 中国兽药杂志, 2014, 48(9): 66-69
- 黄玮,李安兴. 刺激隐核虫及其防治措施的研究. 中国水产, 2005(3): 78-80
- 曹红峰,黄文芳,宋靖芳. 中草药防治鱼病研究进展. 海洋科学, 2006, 30(4): 83-87
- 谢鹏,张敏红. 黄酮类化合物抑菌作用的研究进展. 中国动物保健, 2004(12): 35-37
- 鉏超,张其中,罗芬. 20 种中草药杀灭离体小瓜虫的药效研究. 淡水渔业, 2010, 40(1): 55-60
- Cheung PJ, Nigrelli RF, Ruggieri GD. Studies on cryptocaryoniasis in marine fish: effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951. J Fish Dis, 1979(2): 93-97
- Colorni A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans* and hyposalinity as a control measure in culture gilt-head sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Organ, 1985, 1: 19-22
- Dan XM, Li AX, Lin XT, et al. A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 127-133
- Dan XM, Lin XT, Yan YX, et al. A technique for the preservation

1) 但学明. 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的传代、保存及刺激隐核虫病的防治研究. 暨南大学博士学位研究生论文, 2006

- of *Cryptocaryon irritans* at low temperatures. *Aquaculture*, 2009, 297(1): 112–115
- Diggles BK, Adlard RD. Taxonomic affinities of *Cryptocaryon irritans* and *Ichthyophthirius multifiliis* inferred from ribosomal RNA sequence data. *Dis Aquat Organ*, 1995, 22(1): 39–43
- Tsuyoshi G, Hirazawa N, Takaishi Y, Kashiwada Y. Antiparasitic effects of *Sophora flavescens* root extracts on the ciliate, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture*, 2014, 435: 173–177
- Wright ADG, Colorni A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. *Eur J Protistol*, 2002, 37(4): 375–378

(编辑 江润林)

## The Pesticidal Effects of Chinese Herbal Medicine on the Trophonts and the Theronts of Ciliate *Cryptocaryon irritans* and the Influence of Temperature and Salinity on the Cyst Rupture

LIU Tingting, TANG Xiaoqian, ZHOU Li<sup>①</sup>

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** In this study we performed *in vitro* study on the pesticidal effects of 15 Chinese herbal medicines on the trophonts and theronts of ciliate *Cryptocaryon irritans*, including Betel nut (*Areca catechu*), Bitter ginseng (*Sophora flavescens*), Rhubarb (*Rheum officinale*), Cyrtomium rhizome (*Cyrtomium Rhizoma*), Radix scutellariae (*Scutellaria baicalensis*) and Wild chrysanthemum (*Dendranthema indicum*). We also explored the optimum temperature and salinity for the cyst rupture. At the concentration of 4.55 g/L, Betel nut could kill both the trophonts and the theronts of the ciliate, but Rhubarb and Wild chrysanthemum could only kill theronts. At the concentration of 9.09 g/L, both Bitter ginseng and Cyrtomium rhizome were able to kill the trophonts and the theronts. At the concentration of 18.18 g/L, Radix scutellariae, Toosendan fruit (*Melia toosendan*) and Fructus aurantii (*Citrus aurantium*) could kill the trophonts and the theronts, and Wild chrysanthemum could kill the trophonts. Other herbs could annihilate the trophonts and the theronts at much higher concentrations (45.45 g/L to 90.91 g/L), such as Astragalus root (*Astragalus membranaceus*), Heartleaf houttuynia herb (*Houttuynia cordata*), Isatis root (*Isatis tinctoria*), Chinese bulbul (*Anemone chinensis*), Honeysuckle (*Lonicera japonica*), Radix rehmanniae preparata (*Rehmannia glutinosa*), and Rhizoma coptidis (*Coptis chinensis*). These results suggested that Betel nut, Bitter ginseng, Rhubarb, Cyrtomium rhizome, Radix scutellariae, Toosendan fruit, Fructus aurantii, and Wild chrysanthemum might be more pesticidal than the other herbs, and hence they could be used to control the ciliate. Our study also revealed that the optimum temperature and salinity for the cyst rupture were 26°C and 20–30 respectively.

**Key words** Chinese herbal medicine; Ciliate *Cryptocaryon irritans*; Trophonts; Theronts; Cysts; Temperature; Salinity

① Corresponding author: ZHOU Li, E-mail: zhouli@ouc.edu.cn