

印楝素对鱼的毒性及在鱼类寄生虫病防治上的应用

吴伟*, 朱小惠**

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要: 为探讨印楝素作为鱼用杀寄生虫药物开发的可能性, 选用 ISO 推荐的斑马鱼 *B. rochydaino rerio* 为试材研究了印楝素对鱼的急性毒性。印楝素对斑马鱼 48 h 和 96 h 的 LC_{50} 值分别为 41.9 和 23.3 mg/L, 属中低毒鱼药。采用安全系数 0.1, 印楝素对鱼的安全浓度为 2.3 mg/L。采用鲤鱼 *Cyprinus carpio* Linn. 鱼种为试材, 研究了印楝素对鲤鱼外周血细胞微核产生率的影响。试验表明印楝素不会诱导鲤鱼外周血细胞染色体突变产生微核, 可认为其对养殖鱼类没有致突变性。在研究了印楝素对鱼类安全性的基础上, 将其应用于鱼类寄生虫病——车轮虫病 *Trichodina* sp. 的防治, 在鱼的安全浓度范围内, 印楝素对车轮虫具有良好的杀灭作用, 且呈一定的剂量-效应关系, 表明印楝素具有较好的鱼用杀虫药物开发前景。

关键词: 印楝素; 鱼类; 毒理效应; 寄生虫病

中图分类号: X172; S482

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2003)02-0085-05

鱼类寄生虫病是鱼类养殖业中的主要病害之一, 其流行区域广、时间长, 可引起鱼的大量死亡。以往水产养殖上使用农药、重金属盐类防治鱼类寄生虫病效果不错, 但随着使用时间的推移, 抗药性不断显现。同时这类药物对水产生物具有蓄积残留效应, 可引发水产品质量问题。当前大力推广的健康无公害水产养殖模式迫切需要寻求一种新型的无公害防治药物。

印楝素是从楝科植物印楝 *Azadirachta indica* A. Juss 中提取的三萜化合物, 属于高度氧化的柠檬素类。印楝素对昆虫具有拒食、忌避、调节生长和绝育等多种作用, 在农业上作为杀虫剂使用已取得了良好的效果, 是目前世界上公认的较为理想的植物源农药^[1]。但印楝素作为鱼类寄生虫病防治药物在水产养殖业上的应用至今还未见报道。为此作者对印楝素进入水体环境后可能对鱼类造成的毒理效应进行了研究, 并对其在鱼类寄生虫病防治上的应用作了初步探讨, 以期鱼用药物的开发提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用印楝素由云南中科生物产业有限公司提供, 纯度为 15.25%, 试验前用 DM SO 溶解后配成浓度为 200 mg/L 的溶液。试验鱼类为斑马鱼 *B. rochydaino rerio* 和当年生鲤鱼 *Cyprinus carpio* Linn. 鱼种, 均由本单位试验场提供。试验用病鱼为感染车轮虫的鲫鱼 *Carassius auratus* Linn. 鱼种, 取自江苏省大丰某渔场, 经镜检鱼类鳃瓣每个视野车轮虫的感染强度超过 20 个虫体。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 鱼类急性毒性试验 采用静态的鱼类急性毒性试验法^[2]。试验用水为曝气除氯的自来

作者简介: 吴伟(1967-), 男, 江苏无锡人, 副研究员, 从事生态毒理学和环境生物学的研究

** 华中农业大学 2001 届本科生

水, pH 7.2, DO 5 mg/L , 硬度为 8.5 德国度, 试验水温为 (20 ± 1) 。供试鱼采用 ISO 推荐的斑马鱼, 经筛选和暂养 10 d 以上, 自然死亡率低于 10%。试验前每天投饵, 试验时为防止饵料与试验材料发生反应而禁食。试验前用重铬酸钾作为参考毒物对试验进行质量控制。参考试验结果显示, 重铬酸钾对斑马鱼 24 h 的 LC_{50} 值为 251 mg/L , 在 200~ 400 mg/L 的允许范围之内, 表明这批鱼类毒性试验的用鱼是合格的。将印楝素溶液按等对数间距配制成不同浓度的试验液 3 000 mL, 每个浓度放入试验鱼 10 条, 总计 6 个浓度组, 另设空白对照组和溶剂 (DM SO) 对照组, 观察 0~ 96 h 内鱼类的死亡情况, 用 USEPA 提供的 Speaman-Karber Method 模型求出印楝素对鱼类的 LC_{50} 值^[3]。

1.2.2 鱼类的微核试验 选用当年生体重为 $200 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ 的鲤鱼鱼种为材料, 雌雄各半, 以 $1/20 \sim 1/100 \text{ LC}_{50}$ 的值来选择染毒剂量, 以保证染毒鱼类存活。同时设空白对照、溶剂对照和阳性物 (环磷酰胺, CP) 对照。染毒方式为鱼体胸鳍基部腹腔注射染毒一次。经 24 h 后抽取尾静脉血, 快速制成血涂片。经甲醇固定, Giemsa 染色, 在高倍镜下计数, 每片计数 5 000 个红细胞, 进行鱼类外周血微核的分析, 以“%”表示微核的产生率^[4]。

1.2.3 鱼类寄生虫的杀灭试验 采用静态室内试验法, 在一组水族箱中放入曝气除氯的自来水, 有效体积为 50 L, pH 7.2, DO 5 mg/L , 硬度为 8.5 德国度, 试验水温为 (28 ± 1) 。将感染寄生虫的病鱼移入水族箱中, 每箱 10 条。试验设置 4 个浓度组, 另设空白对照和溶剂对照组。用药后连续观察 3 d, 以寄生虫的生存情况来反映药物的杀虫活性。

2 结果与讨论

2.1 印楝素对鱼类的急性毒性效应

印楝素对斑马鱼的急性毒性试验结果 (见表 1) 表明, 印楝素对斑马鱼的 48、96 h LC_{50} 值分别为 41.9 和 23.3 mg/L , 而在相同的试验条件下, 空白对照和溶剂对照 (DM SO) 对受试鱼类均无急性毒性。根据毒物对鱼类毒性的分级标准^[2], 印楝素对鱼类的毒性为中等偏低。采用安全系数为 0.1, 则印楝素对鱼的安全浓度为 2.3 mg/L 。因印楝素为植物提取物, 且对鱼的毒性低, 故适宜在无公害水产养殖中作为杀虫剂使用, 有取代剧毒农药和硫酸铜等常见鱼用杀虫药物的可能性, 为健康水产养殖用药提供新途径。

Table 1 A cute toxicity of azadirachtin to *B rochydaino rerio*

Concentration $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Death rate (%)		$\text{LC}_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
	48 h	96 h	48 h	96 h
0	0	0		
5	0	0		
9	0	10		
16	20	30	41.9	23.3
28	20	60	(31.9~ 55.1)	(17.3~ 31.4)
39	40	70		
50	70	90		

* The result in table 1 was the average result of three tests. The same as in the following table.

2.2 印楝素对鱼类的微核效应

Hoofman 等最早将微核测试法应用于鱼类^[5], 陈丽玑等 1983 年认为鱼类微核率可以迅速、可靠地反映机体染色体损伤、DNA 复制紊乱等异常状态, 具有实用价值^[6]。故本试验采用鱼类微核试验方法来检测印楝素可能给鱼类所带来的遗传毒性。印楝素对鲤鱼鱼种的微核试验结果见表 2。

Table 2 Result of the micronucleus of carp induced by azadirachtin

Sample	Dose/mg · kg ⁻¹	The analyzed cells	The rate of the micronucleus (‰)
azadirachtin	0	5 000	0.80 ± 0.11
	0.2	5 000	0.72 ± 0.25
	0.4	5 000	0.80 ± 0.18
	0.6	5 000	0.90 ± 0.07
	0.8	5 000	0.74 ± 0.32
DM SO	0.4	5 000	0.80 ± 0.06
	0.6	5 000	0.72 ± 0.12
	0.8	5 000	0.80 ± 0.21
CP	0.32	5 000	10.30 ± 0.23
	0.12	5 000	7.60 ± 0.18

由表 2 可以看出, 印楝素从低到高的 4 个剂量组诱发鲤鱼鱼种外周血细胞的微核率为 0.8‰左右。采用统计检验, 经与空白对照组相比, P 值 > 0.05, 表明其与对照组的试验结果无显著性差异, 即印楝素对鱼类没有致突变活性, 不会引发鱼类产生基因突变。溶剂对照组 (DM SO) 同样无致突变性。与此同时, 已知致突变阳性物环磷酰胺 (CP) 的两个浓度组的微核率高达 7.6‰~ 10.3‰, 经统计与对照组和印楝素组的差异十分显著 ($P < 0.01$)。微核试验表明, 印楝素作为一种天然水体的外来化学物质, 其长期使用后不会导致鱼类的遗传物质发生改变, 不会引起鱼类种质和资源发生衰退, 可作为鱼用药物进行研制和开发。

2.3 印楝素对鱼类寄生虫的杀灭作用

车轮虫病 *Trichodina* sp. 是鱼类寄生虫病中的主要种类。车轮虫属于原生动物, 个体较小, 因形似车轮而得名。能引起鱼类车轮虫病的车轮虫约有 10 多种, 如显著车轮虫 *T. nobilis* Chen、杜氏车轮虫 *T. damerguei* (Wallengren) 和微小车轮虫 *T. minuta* Chen 等^[7]。车轮虫主要寄生在海、淡水鱼类的表皮、鳃及鼻孔内。病鱼因受虫体寄生的刺激, 可引起组织发炎, 分泌大量粘液, 在体表和鳃部形成一层粘液层, 鱼体消瘦发黑, 游动缓慢, 呼吸困难直至死亡。该类寄生虫病在全国各地均有流行, 适宜水温为 20~ 28℃, 每年 4~ 7 月最为流行, 以直接接触而传播, 鱼苗、鱼种均可感染, 死亡率极高。离开鱼体的车轮虫, 能在水中游泳, 转移寄生宿主。此病没有特效药物防治, 目前主要用硫酸铜、农药类药物进行治疗, 因此寻求一种既能有效防治车轮虫病又对养殖鱼类无害的药物一直是广大水产养殖业者的目标。由于印楝素对鱼类的毒性较低, 经细胞微核的遗传毒理学测定表明其对鱼类没有致突变效应, 且其具有拒食、调节虫体生长和发育等作用特点, 因此可用来防治鱼类车轮虫病。印楝素防治鱼类车轮虫病的试验结果见图 1。

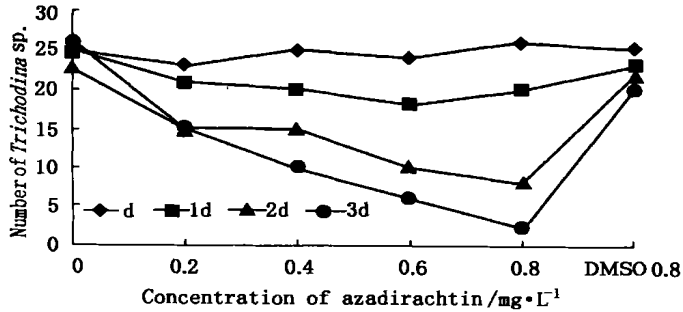


Fig 1 Effect of azadirachtin to the fish disease by *Trichodina* sp.

由图 1 可以看出, 试验 3 d 后, 空白对照和溶剂对照组鱼鳃上的车轮虫数目未见变化, 而印楝素各处理组的车轮虫数目则有一定变化, 且这种变化与印楝素的浓度呈一定的关系。3 d 后, 0.2 mg/L 印楝素处理组病鱼鳃上的车轮虫数减少了 40%, 0.4 mg/L 处理组车轮虫数减少了 60%, 0.6 mg/L 处理组车轮虫数减少了 75%, 0.8 mg/L 处理组车轮虫数减少了 92%, 表明车轮虫数的减少与印楝素的浓度呈正相关。对养殖水体的检查可发现, 低浓度处理组虽然鱼鳃上的车轮虫数减少了, 但虫体从鱼上脱落后还存于水中未死, 虫体四周的纤毛仍在运动; 而高浓度处理组水体中虫体纤毛已停止运动, 胞腔萎缩, 失去了附着能力, 绝大部分虫体已死亡。由此可见, 印楝素对鱼类寄生虫有一定的触杀作用, 其具有较强的细胞渗透性, 对鱼体上寄生的车轮虫有良好的杀灭作用。

近年来, 虽然印楝素的应用有了一定的发展, 但由于成本、使用量和效果等限制, 使其在种植业上的使用受到限制。而将其用于水产养殖业, 解决了水产业对无公害药物的需求, 同时拓宽了印楝素的使用范围。本研究旨在引起水产和农药研究者对印楝素渔用效果的关注, 仅为在此方面的初探, 尚需对印楝素杀灭鱼类寄生虫的机理、开发为渔药并扩大应用范围、印楝素与其他药物复配以提高效价以及印楝素对鱼类生理生化的影响等作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 徐汉虹 杀虫植物和植物杀虫剂[M] 北京: 中国农业出版社, 2001. 174-185
- [2] 程树培 环境生物技术实验指南 [M] 南京: 南京大学出版社, 1995. 177-243
- [3] Hamilton M A., Trimmed spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassay[J] *Environ Sci Technol*, 1978, 11(7): 714-719
- [4] 吴伟, 瞿建宏, 陈家长, 等. 长江下游重点江段水质污染及对鱼类的毒性影响[J] 应用与环境生物学报, 1999, 5(3): 291-295
- [5] Hoofm an R N. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the pasture mudminnow (*Umbryna*) by ethylmethanesulphonate[J] *Mutation Res*, 1982, (104): 147-152
- [6] 陈丽玑. 氧化塘水体中鱼类外周血有核红细胞微核的观察[J] 华中师范学院学报, 1983, 17(4): 76
- [7] 张剑英, 邱兆祉, 丁雪娟, 等. 鱼类寄生虫与寄生虫病[M] 北京: 科学出版社, 1999. 100-102

Toxic Effects on Fishes and Application on the Parasitic Diseases Control by Azadirachtin

WU Wei^{*}, ZHU Xiao-hui

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The toxic effects of azadirachtin on fishes were studied. The results showed that azadirachtin had lower acute toxicity to *B. rochydaino rerio*. The LC₅₀ of *B. rochydaino rerio* by azadirachtin after tested 48 h and 96 h was 41.9 and 23.3 mg/L, respectively. The safe concentration to *B. rochydaino rerio* was 2.3 mg/L. The micronucleus test of carp with azadirachtin indicated that azadirachtin had no mutation activity to the fishes, so azadirachtin could be considered non-mutagen. At the same time, azadirachtin was used in control the parasitic diseases on fishes which caused by *Trichodina* sp.. During the safe concentration to fishes, the better effects on the controlling of parasitic diseases were achieved and there was a relationship between the efficacy and the concentration of azadirachtin. The results also showed that azadirachtin had a good prospect to be used as an agent for controlling the parasitic diseases of fishes.

Key words: azadirachtin; fishes; toxic effect; parasitic diseases

欢迎投稿、订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,主要刊登植物病理学各方面未经发表的研究论文、专题评述、研究简报等文章,内容涵盖植物病害的病原学、植物与病原物相互作用的细胞生物学、生理学、生物化学与分子生物学、植物病原物的致病性与植物的抗病性、植物病害流行病学与生态学以及植物病害及其防治等方面。

自2003年起《植物病理学报》由季刊改为双月刊发行,并采用大十六开铜版纸印刷。《学报》增期、扩版后,年载文量接近120篇,几乎为往年平均年载文量的两倍。《学报》因刊期数、每期载文量限制造成论文出版周期过长(2002年刊出文章平均为18个月)的问题将得到彻底解决;《学报》编辑部还通过各种措施减少其他因素对出版周期的影响,以保证今年起接受的稿件能够在6~12个月内刊出。热切希望广大植物病理学及相关学科的科技工作者踊跃投稿。

《学报》的订阅实行会员优惠政策,对直接从学报编辑部订阅的会员给予15%优惠,全年6期优惠价为100元,欢迎积极订阅。

《植物病理学报》编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路2号中国农业大学植保楼435室,邮编:100094,电子信箱:journal@cspp.org.cn,电话:(010)62892364,传真:(010)62813785,网址:<http://www.cspp.org.cn/publications/apps/actaC.htm>。