

海水鱼类寄生虫刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)趋化性研究*

邹峰¹ 苏永全² 覃映雪¹ 马英¹ 张艺³
韩坤煌⁴ 鄢庆枇¹

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005; 3. 宁德市水产技术推广站 宁德 352101; 4. 宁德市富发水产有限公司 宁德 352103)

摘要 应用本实验室建立的趋化模型对海水鱼类寄生虫刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的趋化特性进行研究。结果显示,刺激隐核虫幼虫在 30min 时趋化达到饱和,在温度 28℃时趋化率达到最高;多种硬骨鱼的血清与粘液对刺激隐核虫的幼虫都有着强烈的吸引作用,刺激隐核虫幼虫对碳水化合物、氨基酸等小分子物质没有趋化作用;在组织匀浆液中,刺激隐核虫幼虫对肌肉匀浆液有一定的趋化作用,对肝、肠、胃的匀浆液都没有趋化作用;感染后鱼类血清对刺激隐核虫的幼虫有着更加强烈的吸引作用($P < 0.01$);18 种中草药中的五倍子、大黄、槟榔、苦楝、虎杖、贯众等 6 种中草药对刺激隐核虫的幼虫有一定的驱虫作用。本文的研究结果有助于深化对刺激隐核虫致病性的认识并对“白点病”的防治有一定的参考价值。

关键词 趋化性;刺激隐核虫;血清;粘液;中草药

中图分类号 S432.1

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)能广泛寄生于热带、亚热带海水鱼身上,由于鱼体受感染的体表、鳍条、鳃上会出现肉眼可见的白点,故名“白点病”。“白点病”是一种世界性鱼类寄生虫病,除软骨类鱼类对其有天然的抵抗力之外,绝大部分硬骨类鱼都能被刺激隐核虫感染,并造成大量死亡(Nigrelli *et al.*, 1966; Burgess *et al.*, 1995)。农业部于 2008 年 12 月在《一、二、三类动物疫病病种名录》中将此病定为国家二类动物疫病。由于养殖模式与该病的暴发关系密切,每年网箱养殖造成的损失要远远大于池塘养殖以及工厂化养殖(樊海平, 2011)。福建作为全国海水鱼类养殖大省,每年因刺激隐核虫病造成的经济损失十分巨大,严重阻碍了水产养殖行业的健康可持续发展。在 2007—2008 年,福建省沿海各个养殖区域都有刺激隐核虫病暴发,最严重的罗源湾接近 4.3 万

口网箱内的所有养殖品种全部感染,死亡率达 80%,经济损失超过了 2 亿元(苏跃中, 2009)。2008—2010 年期间,宁德沙埕港、三都湾以及福州罗源湾都暴发了刺激隐核虫病,平均发病率在 30%—100%之间,局部死亡率也达到 80%,经济损失都超过 1 亿元(陈燕婷, 2011)。

寄生虫的趋化性就是当环境中存在某种物质时,虫体会朝着某一特定方位移动从而产生的一系列反应,即由介质中化学物质浓度差异形成刺激而引起的一种趋向性运动(Paramá *et al.*, 2004)。对纤毛虫的趋化性运动近年来才开始研究(Leick *et al.*, 1994; Fenchel *et al.*, 1999)。据报道,有一些纤毛虫面对猎物释放化学物质时,能转变其摄食器官作为应变(Gómez-Saladin *et al.*, 1993),而纤毛虫的这种趋化机制可能与其入侵感染鱼类息息相关(O'Tool *et al.*, 1999)。虽然刺

* 公益性行业(农业)科研专项, 200903029 号; 国家自然科学基金项目, 31272699 号, 41176115 号; 福建省杰出青年基金项目资助, 2011J06014 号。邹峰, 硕士研究生, E-mail: 271737885@qq.com

通讯作者: 鄢庆枇, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2013-01-08, 收修改稿日期: 2013-03-29

激隐核虫对海水鱼危害巨大,但尚未见其趋化性的研究报道。本文利用平板收集同步胞囊,首次开展刺激隐核虫的趋化性研究,以期深化对刺激隐核虫致病性的认识。

1 材料与方法

1.1 刺激隐核虫

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)于2012年6月分离自宁德市三都澳大湾鱼排患病大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)身上,12℃条件下用过滤海水保存于12孔板内。

1.2 实验用鱼

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)购于集美菜市场,暂养于集美龙舟池海水实验场。健康与感染“白点病”的大黄鱼取自宁德市海水养殖场。健康与感染“白点病”的美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)取自东山县海水养殖场。花尾胡椒鲷(*Plectorhynchus goldmanni*)与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)购买于集美菜市场。

1.3 卵形鲳鲹的感染与刺激隐核虫包囊的收集

将200个于12℃保存的包囊移至28℃培养72h,然后把孵化的幼虫投入暂养卵形鲳鲹的圆桶内,经过2h感染后,把卵形鲳鲹移至另一个装满干净海水的圆桶。大约72h后,卵形鲳鲹身上布满白点,此时将平皿铺在圆桶的底部收集刺激隐核虫包囊。收集的包囊用灭菌海水清洗几次,用12孔板保存于12℃恒温培养箱备用。

1.4 样品制备

血清:丁香酚麻醉实验用鱼,断尾取血,11000g离心5min,然后取上清,-20℃保存备用。

粘液:从每条鱼身上5cm²的皮肤刮取粘液,然后加入1.5mL海水混合,-20℃保存备用。

组织匀浆液:解剖实验用鱼,取肌肉、胃、肠、肝等组织,分别加入10倍体积生理盐水,冰浴匀浆,4℃6000g离心30min,取上清保存于-20℃。

中草药:参照闫茂仓等(2010)方法,称取18种中草药各50g切细磨碎,加入500mL的蒸馏水,煮沸30min后过滤,药渣再加入500mL水,煮沸30min,过滤,将两次的滤液合并,加热蒸发浓缩至50mg,使生药含量为1g/mL。保存于4℃备用。

1.5 刺激隐核虫的趋化性测定

在干净载玻片的一侧滴加50μL含有刺激隐核虫幼虫的海水液滴,在另一侧滴加相同体积的测试溶液,两侧相距2cm,从海水液滴向测试溶液方向用干

净牙签轻轻地划线,使两侧的液滴连通,静置一段时间后在显微镜下观察并计算运动到测试溶液中刺激隐核虫幼虫的数量。用下面的公式来计算趋化率(chemotaxis index, CI)。

$$CI = \text{测试溶液中的幼虫数} / \text{幼虫总数}$$

1.6 数据处理

每组设3个平行,数据用Microsoft Excel与SPSS 17.0软件处理分析,分别用 $P>0.05$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 表示差异不显著、差异显著与差异十分显著。

2 结果与分析

2.1 时间对刺激隐核虫趋化率的影响

以卵形鲳鲹血清为趋化测试溶液,观察刺激隐核虫幼虫的趋化性。随着时间的延长,虫液中的幼虫游动到血清液滴中的数量不断增加。在10min之前,有一半的幼虫已经移动至另一侧,在30min时趋于饱和(图1)。因此,后续趋化实验的时间都设为30min。

2.2 温度对刺激隐核虫趋化性的影响

温度对刺激隐核虫的趋化性有显著影响。在18—28℃之间,随着温度升高,刺激隐核虫的趋化率不断上升,在28℃达到最大值,当温度继续上升时,趋化率急剧下降(图2)。

2.3 刺激隐核虫对不同溶液的趋化性

刺激隐核虫对不同溶液表现出截然不同的趋化

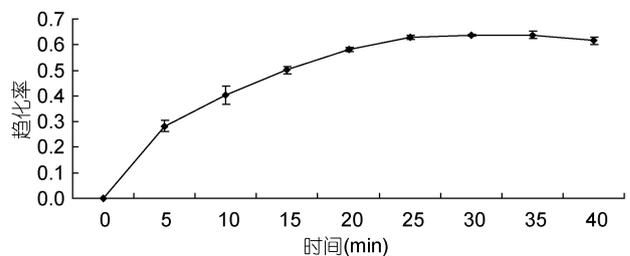


图1 时间对刺激隐核虫趋化率的影响

Fig.1 The impact of incubation time on the CI of *C. irritans* theronts

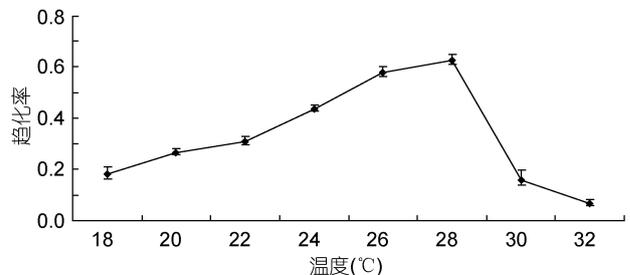


图2 温度对刺激隐核虫趋化率的影响

Fig.2 The impact of incubation temperature on CI of *C. irritans* theronts

性。刺激隐核虫对卵形鲳鲹血清的趋化率高达 0.64, 对卵形鲳鲹肌肉匀浆液的趋化率为 0.32, 而对其它溶液的趋化率都低于 0.1(图 3)。

2.4 刺激隐核虫对不同鱼类血清与粘液的趋化性

从图 4 中可以看出, 刺激隐核虫幼虫对大黄鱼、卵形鲳鲹、包公鱼、美国红鱼以及尼罗罗非鱼的血清与粘液都有着强烈的趋化作用, 而且对 5 种鱼的血清的趋化率都明显高于粘液的趋化率, 且两者之间都存在着极显著性差异($P<0.01$)。

2.5 刺激隐核虫对 3 种鱼类感染前后血清的趋化性

3 种鱼感染前后的血清对刺激隐核虫的趋化率存在显著性差异($P<0.05$)。鱼体感染后血清对刺激隐核虫的趋化率提高了。在这 3 种鱼中, 大黄鱼的血清趋化率最高, 其次是卵形鲳鲹, 最低的是美国红鱼(图 5)。

2.6 刺激隐核虫对 18 种中草药的趋化性

从图 6 中可以看出, 刺激隐核虫幼虫对不同的中草药表现出不同的趋化性。在 18 种浓度为 0.2g/L 的测试中草药中, 刺激隐核虫幼虫对五倍子、贯众、柯子、槟榔、石榴皮、大黄、黄药子、虎杖、苦楝等 9 种中草药的趋化率都极显著($P<0.01$)低于对海水的趋化率。

当把中草药的浓度降低至 0.05g/L 的时候, 刺激隐核虫幼虫对柯子、石榴皮、黄药子等 3 种中草药的趋化率大幅上升到与海水相当的水平, 而对五倍子、贯众、槟榔、大黄、虎杖、苦楝等 6 种中草药的趋化率依然极显著($P<0.01$)低于海水对照组(图 7)。

3 讨论

目前对病原生物趋化性研究主要集中在细菌方面, 如刘力铭等(2010)关于哈维氏弧菌的研究, 以及邹文政等(2009)、鄢庆枇等(2008)关于河流弧菌

趋化性的研究。对寄生虫的趋化性研究鲜有报道, 仅见 Luo 等(2008)对几种海水鱼的血清与粘液对刺激隐

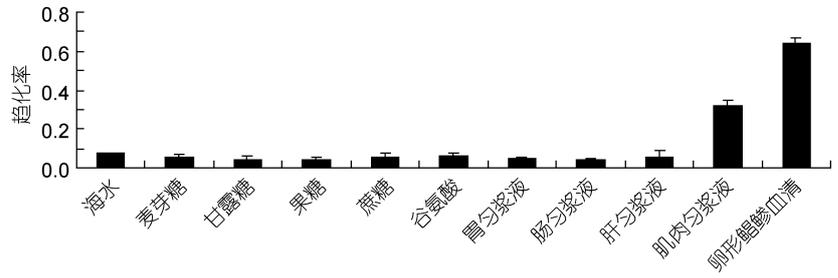


图 3 刺激隐核虫在不同溶液中的趋化率
Fig.3 The CI of the *C. irritans* theronts in different solution

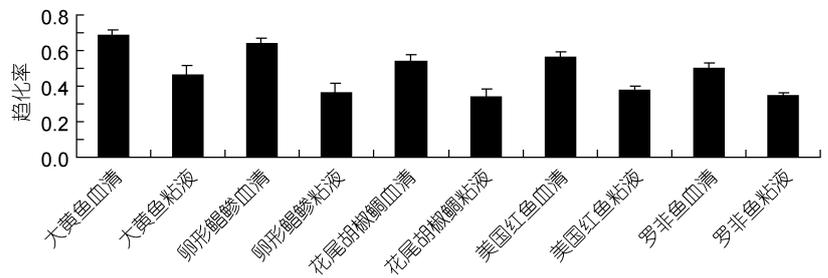


图 4 刺激隐核虫对不同鱼类血清与粘液的趋化率
Fig.4 The CI of *C. irritans* theronts to the sera and mucus of various teleost

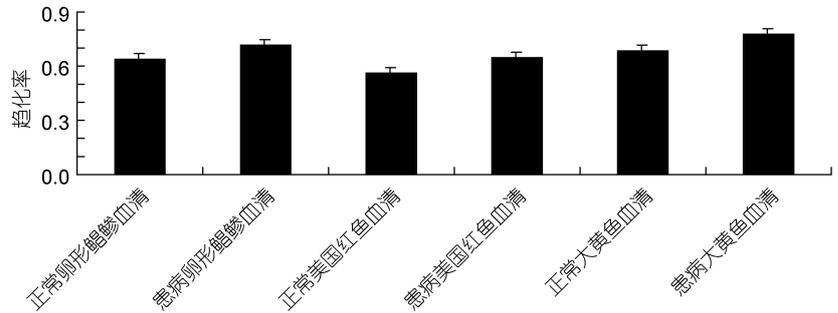


图 5 刺激隐核虫对 3 种鱼类感染前后血清的趋化率
Fig.5 The CI of the *C. irritans* theronts to the sera of 3 kinds of uninfected and infected teleost

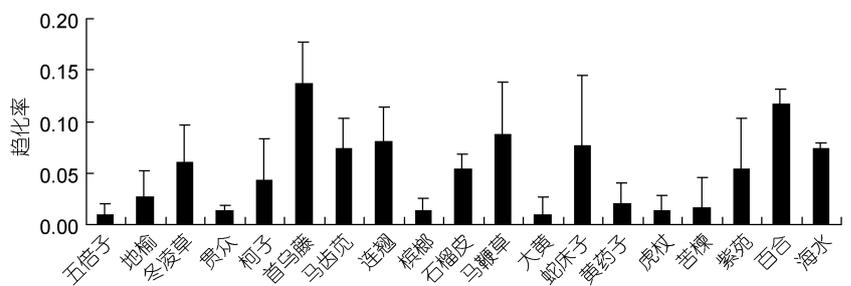


图 6 刺激隐核虫对 18 种中草药的趋化率
Fig.6 The CI of *C. irritans* theronts to 18 kinds of Chinese medicinal herb
注: 测试中草药浓度均为 0.2g/L

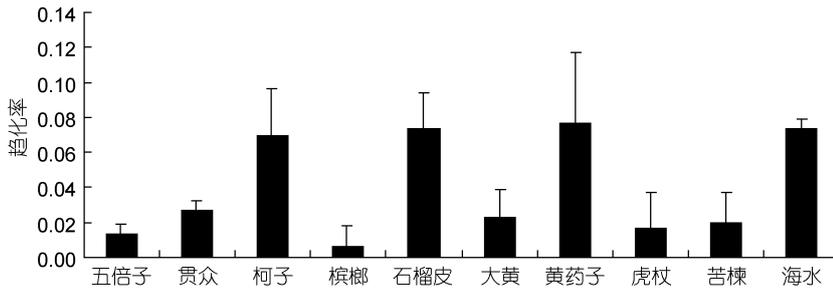


图 7 刺激隐核虫对 9 种中草药的趋化率

Fig.7 The CI of *C. irritans* theronts to 9 kinds of Chinese medicinal herb

注: 测试中草药浓度均为 0.05g/L

核虫幼虫化学驱动作用的简单介绍, 尚无刺激隐核虫趋化性研究的研究报道。

在趋化性研究过程中使用最多的方法是毛细管趋化(Leick *et al.*, 1983), 也有学者仅仅用两个房室连通进行纤毛虫对各种物质的趋化性研究(Köhida *et al.*, 1994; Csaba *et al.*, 2000)。本实验参考草履虫趋化研究的方法, 借助于载玻片, 利用牙签让两侧的液滴形成通道以进行趋化实验的研究。此方法的优点是方便简单、便于计数以及能进行动态观察与拍照。

在进行时间对刺激隐核虫趋化性研究中发现, 刺激隐核虫能在短时间内完成整个趋化过程, 30min 时趋化就基本趋于饱和状态。刺激隐核虫对温度的适应能力很强, 大部分的虫体在 10—30℃ 之间都能生存。本实验发现在 26—28℃ 之间刺激隐核虫的趋化率是最高的。可能是因为在这个温度范围内刺激隐核虫的活力最强, 对外源趋化物质的敏感性最高, 这就增加了虫体寻求宿主感染宿主的几率, 这也很好地解释了当海区温度在这个范围内时, 往往会暴发“白点病”的原因。而当温度低于 20℃ 时, 刺激隐核虫的生长发育速度明显减缓, 幼虫的活动能力也大大减弱, 当冬季海区温度降至 10℃, 刺激隐核虫的包囊进入类似休眠的状态, 绝大部分虫体通过这种方式存活下来, 当温度回升时再孵化感染宿主, 这可能是虫体在进化过程中形成的一个自我保护机制, 这也给海区“白点病”的治疗带来的极大的困难。当温度达到 30℃ 的时候, 刺激隐核虫的生长发育并没有减缓的趋势, 但是通过本实验发现其对趋化物质的敏感性大为降低, 这也很好地解释了当海区温度达到 30℃, 刺激隐核虫病害的暴发并不严重的原因。多种硬骨类鱼的血清, 甚至淡水鱼类的血清对刺激隐核虫都有着强烈的吸引作用, 这也间接反映了刺激隐核虫感染宿主的低特异性。血清的趋化性同时也解释了皮肤

受损的鱼更易受到感染的原因(Paramá *et al.*, 2003)。有文献指出小瓜虫入侵宿主皮肤是通过高密度的粘液细胞, 因为粘液细胞中含有血清(主要是宿主的免疫球蛋白)(Buchmann *et al.*, 1999)。感染后的鱼血清对刺激隐核虫幼虫的吸引力大于未感染的鱼血清, 这可能是刺激隐核虫能反复感染海水鱼的原因之一。虽有报道一些小分子物质对鱼类寄生虫存在着趋化作用(Reddy *et al.*, 1997), 但刺激隐核虫对小分子物

质(碳水化合物、糖类、氨基酸)没有趋化性, 这可能是由于不同的鱼类寄生虫对于趋化物质的选择性不一样所致。刺激隐核虫幼虫对鱼类肌肉匀浆液有一定的趋化作用, 但对胃、肝脏、肠道匀浆液都没有趋化作用, 这与刺激隐核虫的感染特点有关。刺激隐核虫在感染过程中主要接触宿主的粘液、血清和肌肉, 而胃、肝脏、肠道都不是刺激隐核虫的感染部位。有报道表明, 多数鱼类在夜间不活跃甚至是处于迟钝状态(Starck *et al.*, 1966; Randall, 1983; Lowe-McConnell, 1987)。而大部分刺激隐核虫的包囊是在夜间脱胞孵化出幼虫, 这似乎是增大了幼虫感染宿主几率, 同时幼虫可能是通过趋化作用去定位然后感染宿主入侵皮肤最终寄生于宿主体内。

中草药具有价格低廉、来源广泛、环保、副作用小、不易产生抗药性等优点, 已被广泛用于水产养殖的病害防治, 但刺激隐核虫对中草药的趋化性尚未见报道。本文发现刺激隐核虫幼虫对五倍子、大黄、苦楝、槟榔、虎杖、贯众等 6 种中草药的趋化性极显著低于海水对照组, 说明这些中草药有一定的驱虫效果。

参 考 文 献

- 刘力铭, 钱爱霞, 鄢庆彬等, 2010. 哈维氏弧菌 TS-628 菌株趋化性研究. 渔业科学进展, 31(6): 104—109
- 闫茂仓, 陈少波, 单乐州等, 2010. 22 位中草药对创伤弧菌与灿烂弧菌体外抑菌作用筛选. 水生生态杂志, 3(2): 95—97
- 苏跃中, 2009. 福建省主要养殖区海水网箱养殖鱼类刺激隐核虫病的调查及防控对策. 水产科技情报, 36(1): 5—7
- 邹文政, 纪荣兴, 义家波等, 2009. 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用. 水产学报, 33(2): 318—325
- 陈燕婷, 2011. 福建省夏季网箱养殖鱼类主要病害情况及对策. 中国水产, (9): 48—51
- 鄢庆彬, 邹文政, 纪荣兴等, 2008. 河流弧菌对牙鲆粘液的趋化和粘附作用. 海洋与湖沼, 39(4): 362—367

- 樊海平, 2011. 福建省水生动物病害防控学科发展现状与设想. 福建水产, 33(3): 48—51
- Buchmann K, Lindenstrøm T, Sigh J, 1999. Partial cross protection against *Ichthyophthirius multifiliis* in *Gyrodactylus derjavini* immunized rainbow trout. Journal of Helminthology, 73(3): 189—196
- Burgess P J, Matthews R A, 1995. Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora). Journal of Fish Biology, 46(4): 727—729
- Csaba G, Kovacs K, Kohidai L, 2000. Effect of oxytocin and its analogues on the chemotaxis of *Tetrahymena*: evolutionary conclusions. Acta Protozoologica, 39(4): 345—347
- Fenchel T, Blackburn N, 1999. Motile chemosensory behaviour of phagotrophic protists: Mechanisms for and efficiency in congregating at food patches. Protistology, 150(3): 325—336
- Gómez-Saladin E, Small E B, 1993. Oral morphogenesis of the microstome to macrostome transformation in *Miamiensis avidus* strain Ma/2. Eukaryotic Microbiology, 40(3): 363—370
- Köhidai L, Karsa J, Csaba G, 1994. Effects of hormones on chemotaxis in *Tetrahymena*: investigations on receptor memory. Microbios, 77(311): 75—85
- Leick V, Helle J, 1983. A quantitative assay for ciliate chemotaxis. Analytical Biochemistry, 135(2): 466—469
- Leick V, Koppelhus U, Rosenberg J, 1994. Cilia-mediated oriented chemokinesis in *Tetrahymena thermophila*. Eukaryotic Microbiology, 41(6): 546—553
- Lowe-McConnell R H, 1987. Ecological Studies in Tropical Fish Communities. Cambridge University Press, 45—66
- Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q *et al*, 2008. Some characteristics of host-parasite relationship for *Cryptocaryon irritans* isolated from South China. Parasitol Research, 102(6): 1269—1275
- Nigrelli R F, Ruggieri G D, 1966. Enzootics in the New York aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (*Ichthyophthirius marinus* Sikama, 1961), a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fishes. Zoologica, 51(9): 97—102
- O'Tool R, Lundberg S, Fredriksson S Å *et al*, 1999. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. Journal of Bacteriology, 181(40): 4308—4317
- Paramá A, Iglesias R, Alvarez M F *et al*, 2003. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 217(1): 73—80
- Paramá R, Iglesias M F, Alvarez M L *et al*, 2004. Chemotactic responses of the fish-parasitic scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* to blood and blood components of the turbot *Scophthalmus maximus*, evaluated using a new microplate multiassay. Journal of Microbiological Methods, 58(3): 361—366
- Randall J E, 1983. Caribbean Reef Fishes. Neptune City, New Jersey: TFH Publications, 135—140
- Reddy A, Frazer B A, Fried B, 1997. Low molecular weight hydrophilic chemicals that attract *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni cercariae*. International Journal for Parasitology, 27(3): 283—287
- Starck W A, Davis W P, 1966. Night habits of fisher of Alligator Reef, Florida. Ichthyologica, 38(4): 313—356

CHEMOTAXIS OF MARINE FISH PARASITE *CRYPTOCARYON IRRITANS*

ZOU Feng¹, SU Yong-Quan², QIN Ying-Xue¹, MA Ying¹, ZHANG Yi³,
HAN Kun-Huang⁴, YAN Qing-Pi¹

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005; 3. Ningde Aquatic Product Technology Promotion Department, Ningde, 352101; 4. Ningde Fufa Aquatic Product Co. Ltd, Ningde, 352103)

Abstract The chemotaxis of *Cryptocaryon irritans* theronts was studied by a new method established in our laboratory using various substances including natural herbs. The results show that the chemotaxis increased with incubation time and reached the saturation in 30 min. The highest chemotaxis was recorded at 28°C. The theronts showed strong chemotaxis to the serum and mucus of various teleost in the fish muscle homogenates but in the stomach, intestines, and liver homogenates as well as small molecular substances such as carbohydrates and amino acids. However, much stronger chemotaxis of *C. irritans* theronts was found in the sera of infected teleost ($P < 0.01$). In addition, 18 Chinese medical herbs were used to study the repellent effect to *C. irritans* theronts and 6 of them showed repellent effect to *C. irritans* theronts. The results are conducive to a better understanding to the pathogenesis of *C. irritans* as well as to the prevention and treatment of “white-spot disease”.

Key words chemotaxis; *Cryptocaryon irritans*; serum; mucus; Chinese medical herb