

DOI:10.3724/SP.J.1118.2017.16166

槟榔、川楝子复方中草药对大黄鱼 4 种酶活性的影响及对刺激隐核虫的杀灭效果分析

崔晓翠^{1,2}, 王印庚², 陈霞³, 张正², 李彬², 柯巧珍⁴, 常亚青¹

1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛九洋红水产科技有限公司, 山东 青岛 266071;
4. 大黄鱼育种国家重点实验室 福建福鼎海鸣水产食品有限公司, 福建 宁德 352103

摘要: 海水小瓜虫病是养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和数十种海水鱼类较难控制的主要疾病, 它是由刺激隐核虫(*Cryptopharyx irritans*)感染引发, 严重威胁鱼类养殖产业的健康发展。本研究利用复方中草药“HD-2”(槟榔、川楝子、绵马贯众、大青叶、穿心莲等以一定比例混合, 超微粉碎经过 200 目过筛后收集粉末)投喂大黄鱼, 研究大黄鱼溶菌酶(LZM)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)等非特异性免疫指标变化和不同用药方式对刺激隐核虫的杀灭效果。结果显示, 口服“HD-2”可以促进鱼体 LZM、T-SOD、AKP、ACP 活性升高, 以添加 2% 中草药组在提高 4 种酶活性方面作用显著, 投喂后第 14~21 天酶活性最高。“HD-2”对体外刺激隐核虫幼虫的杀灭实验证实: 4 h 内在 50 mg/L 浓度下对幼虫没有杀伤作用, 80 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 浓度分别可以杀死 20%、54%、89% 的幼虫, 400 mg/L 浓度下幼虫被全部杀死, 幼虫 4 h 半致死浓度为 109 mg/L。在室内为期 15 d 的大黄鱼小瓜虫病治疗实验中, A 组按 20 g/kg 添加“HD-2”药物口服, 同时按 100 mg/L 浓度药浴, 存活率为 50%; B 组按 20 g/kg 添加药物口服, 同时按 50 mg/L 浓度药浴, 存活率 50.67%; C 组, 在无药浴情况下, 仅按 20 g/kg 添加药物口服, 存活率为 42.67%; A、B、C 组存活率均显著高于对照组存活率 2.67% ($P<0.05$)。此外, A、B、C 3 组中, 大黄鱼胸鳍上白点数量明显少于对照组; 同时, 3 个组的大黄鱼鳃丝上隐核虫数量均呈显著下降趋势 ($P<0.05$), 实验结束时几乎观察不到虫体; 而对照组大黄鱼鳃丝上隐核虫数量明显上升。实验过程中 A、B、C 3 组大黄鱼释放到体外的包裹数量明显下降, 第 12 天时其包裹数量分别下降 100%、91.1%、77.7%, 与对照组差异极显著 ($P<0.01$)。综上所述, 口服和药浴同时用药具有最佳效果, 仅口服中草药亦能达到良好治疗效果。从实用性和成本考虑, 建议仅进行口服处理, 即能保障大黄鱼较高成活率, 中草药添加量为 2%, 投喂时间为 6~14 d。该结果为防控鱼类小瓜虫病提供了理论参考和技术支撑, 在养殖生产中将具有良好的应用前景。

关键词: 大黄鱼; 刺激隐核虫; 非特异性免疫; 包裹; 滋养体; 中草药; 半致死浓度

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0362-12

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属石首鱼科 (Sciaenidae), 黄鱼属, 俗称黄花鱼, 为中国特有的地方性种类, 福建、浙江沿海为养殖主产区^[1], 其肉质细腻、味道鲜美, 备受人们青睐, 具有很高

的营养价值。随着大黄鱼人工育苗繁殖技术的日益成熟, 充足的苗种为大黄鱼规模化养殖提供了良好基础, 福建省大黄鱼养殖产量由 2006 年的 40 kt 迅速增加到 2014 年的 110.45 kt^[2]。目前, 养

收稿日期: 2016-05-27; 修订日期: 2016-07-17.

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B03); 福建省科技重大专项专题(2013NZ0002-5); 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205).

作者简介: 崔晓翠, 女, 硕士研究生. E-mail: s9cuixiaocui@126.com

通信作者: 王印庚, 研究员. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

殖的大黄鱼已经远销国内外多个地区,成为福建省的名优水产品之一^[2-4]。然而,由于养殖户过于追求养殖产量,不断加大网箱养殖规模和养殖密度,造成大面积连片养殖、水域生态环境恶化,进而导致各种疾病的频繁发生。其中刺激隐核虫病是危害严重的寄生性纤毛虫病之一,能够侵害包括大黄鱼在内的数十种海水鱼类,严重威胁养殖产业的健康发展。它是由刺激隐核虫(*Cryptopharyngodon irritans*)感染引发,在鱼体表、鱼鳍组织和鳃丝内寄生,由此形成肉眼可见的白点,所以也称“白点病”^[5-10]。刺激隐核虫的生活史包括幼虫(theront)、滋养体(trophont)、包囊前体(protomont)、包囊(tomont) 4 个阶段,生活史周期一般为 8~13 d,且不更换宿主^[9, 11-13]。滋养体离开宿主进入包囊前体阶段,包囊前体一般掉落水中,脱掉纤毛后形成具有厚壁的包囊。包囊经过多次不对称二分裂,形成子代幼体,幼体从包囊里释放出来形成幼虫,每个包囊平均可以产生 292 个幼虫^[13]。幼虫逸出后快速游动寻找宿主并钻入宿主的鳃或寄生在体表、鳍、眼睛等组织器官表面^[14]。其中寄生在鳃丝内的刺激隐核虫对鱼危害最为严重,大量寄生可破坏鳃组织,出现充血、出血直至溃烂,导致宿主窒息死亡。寄生在大黄鱼体表的刺激隐核虫通常以宿主完整的细胞或组织碎片为食,会造成淋巴细胞浸润,病灶局部坏死和上皮组织增生变异等病理变化^[15]。此外,体表寄生隐核虫使鱼应激反应强烈,躁动不安,厌食甚至停食,严重妨碍鱼的生长,降低养殖成活率 and 经济效益^[16]。

目前,关于刺激隐核虫病治疗的文献报道大多使用的是化学药物,福尔马林、硫酸铜、双氧水、次氯酸钠、盐霉素、磺胺类抗生素等都被证实能够杀灭刺激隐核虫的成虫和幼虫,缓解病情,对刺激隐核虫病具有一定的治疗效果^[17-20],但临床应用还存在很多问题。此外,化学药物本身存在一些不足,如对养殖动物毒性较大,极易因操作不当而引起养殖动物中毒死亡;化学药物副作用较大,在正常剂量下使用也常导致病鱼厌食或生长变慢;药物易残留,对生态环境和食品安全都构成潜在威胁。而中草药具有药源广泛、对环境无污染、药物不易残留、对鱼体副作用小等优

点,近几年逐渐成为防控水产动物寄生虫病的重要研究方向^[21]。相关的研究发现,槟榔、乌梅、飞龙掌血等多种中草药对多子小瓜虫具有非常理想的杀灭作用^[22-23],这为筛选针对刺激隐核虫的中草药提供了极有价值的参考。本文在前期研究的基础上,筛选和组方了一种针对刺激隐核虫病的以槟榔、川楝子、大青叶等为主要成分的专用复方中草药“HD-2”,研究其对大黄鱼溶菌酶(LZM)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)等非特异性免疫指标变化的影响,并进行了针对刺激隐核虫幼虫和鱼体内寄生的滋养体的杀灭效果研究,以期为有效治疗鱼类刺激隐核虫病提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验所用中草药

实验用中草药复方“HD-2”为前期本实验室筛选和配伍组方而成,主要成分为槟榔、川楝子、绵马贯众、大青叶、穿心莲按表 1 所示比例混合,超微粉碎经过 200 目过筛后收集粉末备用。

表 1 复合草药 HD-2 配比

Tab. 1 The proportion of compound herbal HD-2

中药植物名 herb species	重量比例 ratio in weight
槟榔 <i>Areca catechu</i> L.	3
川楝子 <i>MeLia toosendan</i> Sieb. et Zucc	1
绵马贯众 <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	2
大青叶 <i>Folium isatidis</i>	2
穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Nees	2

称取 2 g 药粉,加入 400 mL 蒸馏水经文火煎煮 1 h,冷却后经多层灭菌筛绢网过滤后再用灭菌海水定量调制成 1 g/L 的母液,5~7℃放置备用。

1.2 口服 HD-2 对大黄鱼 4 种酶活性的影响

采用单因子浓度梯度设计方法,将实验鱼随机分为 4 组,以福建天马科技集团有限公司生产的大黄鱼配合饲料作为基础饲料,饲料中分别添加 0(对照)、1%、2%、4%质量分数的中草药进行投喂,并分别记为对照组和 1%、2%、4%添加组。各组均设 3 个平行,每个平行 30 尾鱼,连续投喂 30 d。实验期间环境条件和饲养管理与暂养期相同。

1.2.1 样品的制备 实验鱼摄食药饵后第 7、14、21、28 天, 每组各选 3 尾鱼、称重、尾静脉采血, 将所采集到的血液在室温下静置凝固后, 置于 4℃ 冰箱 4 h, 于 4℃ 条件下以 4000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 用于测定血清相关酶活性。血清相关酶指标包括溶菌酶(LZM)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)。

1.2.2 血清 LZM 活性测定 按照南京建成生物工程研究所生产的 LZM 检测试剂盒说明书, 采用空白对照法测定 LZM。具体操作方法见表 2。

表 2 溶菌酶活性测定操作方法 Tab. 2 Method to determine LZM				mL
样品 sample	空白孔 blank hole	标准孔 standard hole	测定孔 measure hole	
双蒸水 ddH ₂ O	0.2			
2.5 μg/mL 溶菌酶标准 应用液 standard		0.2		
血清 serum			0.2	
应用菌液 test bacterial liquid	2.0	2.0	2.0	

试液混匀, 37℃ 准确水浴 5 min, 立即取出置于 0℃ 以下的冰水浴中 3 min, 逐管取出倒入 1 cm 光径比色皿中, 530 nm 处以双蒸水调透光度 100%, 比色, 测各管透光度 T_{15} 。

溶菌酶含量计算公式为:

$$\begin{aligned} \text{LZM 含量(U/mL)} = & \frac{\text{测定透光度}UT_{15} - \text{空白透光度}OT_{15}}{\text{标准透光度}ST_{15} - \text{空白透光度}OT_{15}} \times \\ & \text{标准品浓度(200 U/mL)} \end{aligned}$$

1.2.3 血清 T-SOD 活性测定 按照南京建成生物工程研究所生产的 T-SOD 检测试剂盒说明书, 采用羟胺法测定 T-SOD。具体操作方法见表 3。

表 3 总超氧化物歧化酶活性测定操作方法 Tab. 3 Method to determine T-SOD			mL
试剂 reagent	测定管 measure tube	对照管 control	
试剂 1-应用液 Reagent 1-application solution	1.0	1.0	
血清 serum	0.2		
双蒸水 ddH ₂ O		0.2	
试剂二 Reagent 2	0.1	0.1	
试剂三 Reagent 3	0.1	0.1	
试剂四-应用液 Reagent 4-application solution	0.1	0.1	

用涡旋混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 min。每管均加入显色剂 2 mL。混匀, 室温放置 10 min, 于波长 550 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 双蒸水调零, 比色。

血清 T-SOD 活力计算公式为:

$$\begin{aligned} \text{T-SOD 活力(U/mL)} = & \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{对照OD值}} \div \\ & 50\% \times \text{反应体系的稀释倍数} \end{aligned}$$

1.2.4 血清 AKP 活性测定 按照南京建成生物工程研究所生产的 AKP 检测试剂盒说明书, 采用微量酶标法测定血清 AKP。具体操作方法见表 4。

表 4 碱性磷酸酶活性测定操作方法 Tab. 4 Method to determine AKP				μL
试剂 reagent	空白孔 blank hole	标准孔 standard hole	测定孔 measure hole	
双蒸水 ddH ₂ O	5			
0.1 mg/mL 酚标准应用液 phenol standard		5		
血清 serum			5	
缓冲液 buffer solution	50	50	50	
基质液 base solution	50	50	50	
充分混匀 37℃ 水浴 15 min				
显色剂 color developing agent	150	150	150	

轻轻振摇孔板混匀, 波长 520 nm, 酶标仪测定各孔吸光度 OD 值。

血清中 AKP 计算公式:

$$\begin{aligned} \text{AKP 活力(金氏单位/100 mL)} = & \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \\ & \text{酚标准品浓度(0.1 mg/mL)} \times 100 \text{ mL} \end{aligned}$$

1.2.5 血清 ACP 活性测定 按照南京建成生物工程研究所生产的 ACP 检测试剂盒说明书, 采用微量酶标法测定血清 ACP。具体操作方法见表 5。

轻轻振摇孔板混匀, 静置 10 min, 波长 520 nm, 酶标仪测定各孔吸光度 OD 值。

血清中 AKP 计算公式:

$$\begin{aligned} \text{ACP 活力(金氏单位 / 100 mL)} = & \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \\ & \text{酚标准品浓度(0.1 mg/mL)} \times 100 \text{ mL} \end{aligned}$$

表 5 酸性磷酸酶活性测定操作方法
Tab. 5 Method to determine ACP

试剂 reagent	空白孔 blank hole	标准孔 standard hole	测定孔 measure hole
双蒸水 ddH ₂ O	4		
0.1 mg/mL 酚标准应用液 phenol standard		4	
血清 serum			4
缓冲液 buffer	40	40	40
基质液 base solution	40	40	40
充分混匀 37℃ 水浴 30 min			
碱液 alkali liquor	80	80	80
显色剂 color developing agent	80	80	80

1.3 中草药对刺激隐核虫幼虫的药浴杀灭实验

在发病网箱中挑选 50 尾感染刺激隐核虫病症状明显的大黄鱼暂养于容积为 1 t 的玻璃钢桶内, 2 d 后, 用虹吸方法将掉落于桶中的刺激隐核虫包裹收集到盛有灭菌海水的洁净烧杯中, 在 27℃ 条件下连续充气培养, 12 h 换一次灭菌海水。培养 48 h 确认有较多幼虫孵出的情况下, 吸净含幼虫的海水并重新加入 100 mL 灭菌海水, 30 min 后收集孵化的虫液, 以确保收集同期孵化的高活力幼虫。将收集的虫液稀释至浓度为 200 只/mL 备用。

将虫液加入 24 孔培养板中, 每孔加 0.5 mL 虫液, 药物处理组加“HD-2”中草药药液, 以无菌海水调节药物终质量浓度分别保持在 50 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L, 每浓度组设 3 个平行组, 对照组加 0.5 mL 无菌海水。每隔 1 h, 将培养板置于倒置显微镜下观察, 计数沉底死亡的幼虫数量, 从而计算幼虫的存活率, 3 组平行分别计数后取平均值。其中幼虫死亡的判断标准为虫体不再运动、体纤毛停止摆动 30 s 以上。

1.4 中草药对刺激隐核虫滋养体的口服+药浴联合杀灭实验

根据实验室前期的实验结果确定本次实验口服剂量为 20 g/kg^[15]。实验分为 4 个组, A 组 (Group A): 按 20 g/kg 饲料剂量添加“HD-2”药粉口服, 同时按 100 mg/L 浓度进行药浴; B 组 (Group B): 按 20 g/kg 饲料剂量添加“HD-2”药粉

口服, 同时按 50 mg/L 浓度进行药浴; C 组 (Group C): 按 20 g/kg 饲料剂量添加“HD-2”药粉口服, 无药浴; 对照组投喂普通饲料, 无药浴。药浴方法: 将药物煎煮后放凉至室温, 按照设定浓度对大黄鱼进行浸泡药浴。药浴时间每天 19:00 到第 2 天上午 7:00 进行 12 h, 每天上午 8:00 投喂药饵。

实验用鱼取自福建省宁德市某大黄鱼养殖公司。在刺激隐核虫病发生期间, 从养殖网箱中随机取 5 尾鱼, 用镊子刮取病鱼体表黏液并剪下病鱼左边第二片鳃制成水浸片, 置于光学显微镜下观察, 确认该网箱已感染刺激隐核虫病。之后, 从该网箱中随机挑取一定数量的发病鱼转移至室内养殖桶中暂养 3 d, 从中选取体重(30±2.5) g, 体表有少量“白点”, 体色、活力、摄食相对正常的处于患病初期的大黄鱼 1200 尾平均分为 4 组, 每组设 6 个平行, 每个平行组 50 尾鱼。实验过程中, 将其中 3 个平行组作为取样组, 另外 3 个平行组用于统计存活率。实验容器为容积为 1 t、内壁光滑的玻璃钢桶, 实验期间连续充氧, 每天早上正常投饵一次, 每天换水 50%。换水时, 采用底层排水的方式将沉底的包裹用刷子刷洗并排出桶外。

实验用水经 2 级砂滤过滤后, 再在蓄水桶中静置 2 d, 确保水中没有包裹和幼虫。实验期间水温稳定在 28~30℃, 盐度 30, 溶解氧 3.5~5.0 mg/L, pH 7.9~8.2。

在实验开始的前 1 天及实验的第 2、5、8、11 天 19:00 时在每个养殖桶底部相同位置放置 3 个直径 9 cm 的培养皿, 第 2 天上午 7:00 时取出培养皿, 计数每组培养皿中收集的包裹个数取其平均数, 按照培养皿面积和桶底面积的比例推算出该桶平均每尾鱼 12 h 掉落的包裹数目。实验第 0、3、6、9、12 天在每个取样组中随机取 3 尾鱼麻醉后将其两侧胸鳍(由于大黄鱼胸鳍上滋养体数目在显微镜下更容易计数, 因此本文以胸鳍上滋养体数目作为体表感染情况的代表)及左侧第二片鳃剪下制成水浸片, 再置于光学显微镜下计数刺激隐核虫滋养体数量。另外, 每天观察体色、活力、摄食状态, 并记录鱼的死亡数量等。实验共进行 15 d。

1.5 数据分析

实验数据用 Microsoft Excel 和 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析,当差异显著时($P<0.05$),用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 复方中草药对大黄鱼血清相关酶活性的影响

投喂 1%、2%、4% 中草药“HD-2”对大黄鱼血清样品中溶菌酶(LZM)活性的影响见(图 1)。添加不同剂量复方中草药均可以使大黄鱼血清 LZM 活性升高。第 14 天达到最高值,第 21 天时 LZM 活性出现下降,但仍然显著高于对照组($P<0.05$)。到第 28 天时各个剂量组 LZM 活性变化不明显并与对照组差异不显著($P>0.05$)。其中,添加 2% 药物剂量组 LZM 活性始终高于其他各组。

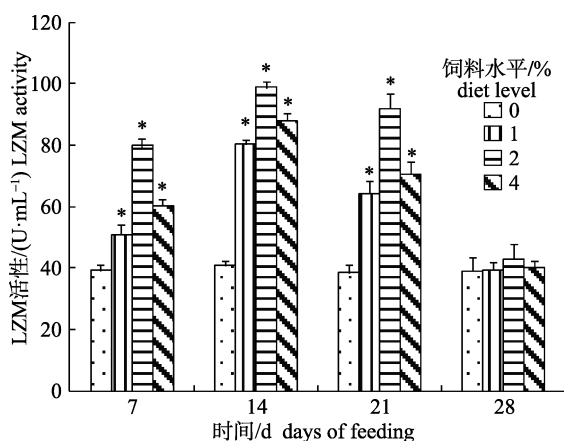


图 1 复方中草药 HD-2 对大黄鱼血清 LZM 活性的影响
“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 Effects of HD-2 on lysozyme activity of *L. crocea*
“*” represents significant difference from control.

投喂不同剂量的复方中草药 28 d 对大黄鱼血清样品的 T-SOD 活性的影响结果(图 2)表明,投喂不同剂量中草药均可以使大黄鱼血液 T-SOD 活性升高。除第 28 天外其余各取样时间点 T-SOD 活性均显著高于对照组($P<0.05$)。第 28 天时各剂量组及对照组的 T-SOD 活性均恢复到初始状态。实验过程中,4 个取样时间点中投喂添加 2% 药物的剂量组 T-SOD 活性在第 14 天升高最明显,达到 65.22 U/mL,且添加 2% 药物的剂量组的 T-SOD 活性在各个取样时间点都高于其他各组。

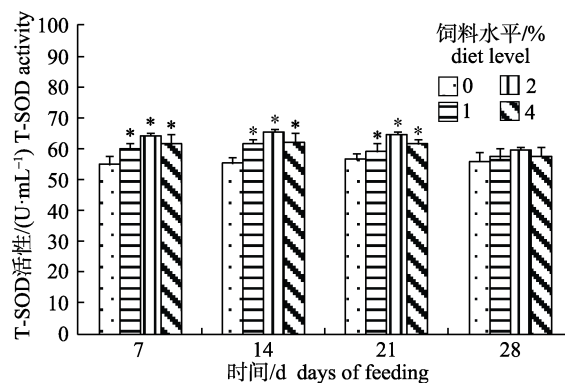


图 2 HD-2 对大黄鱼血清 T-SOD 活性的影响
“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 Effects of HD-2 on superoxide dismutase activity of *L. crocea*
“*” represents significant difference from control.

投喂添加不同剂量的复方中草药 HD-2 对大黄鱼血清样品中碱性磷酸酶(AKP)活性的影响见图 3。添加不同剂量复方中草药都能够使大黄鱼血清 AKP 活性呈现先升高后下降的趋势。在第 21 天取样时添加 2% 剂量复方中草药的实验组,AKP 活性达到 7.93 金氏单位/100 mL,为各个取样时间点的最高值。随着投喂时间的延长 AKP 活性没有一直升高,第 21 天到第 28 天在取样点出现下降的趋势,但仍然高于对照组且与对照组有显著差异($P<0.05$)。添加 2% 药物剂量组的 AKP 活性在各取样点测得的数据始终高于其他各组。

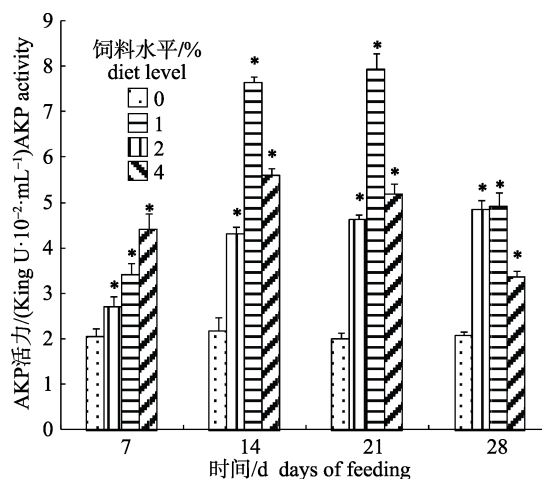


图 3 HD-2 对大黄鱼血清 AKP 活性的影响
“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Effects of HD-2 on alkaline phosphatase activity of *L. crocea*
“*” represents significant difference from control.

经过 28 d 的投喂实验, 添加不同剂量中草药 HD-2 对大黄鱼血清样品中酸性磷酸酶(ACP)活性的影响见图 4。添加不同剂量复方中草药均使大黄鱼血清 ACP 活性升高。在第 21 天取样时, 添加 2% 药物组的 ACP 活性达到最高值, 为 4.19 金氏单位/100 mL。随着投喂时间的延长, ACP 活性没有一直升高, 而是出现下降的趋势, 在第 28 天时各个投喂药物组 ACP 活性虽然仍略高于对照组但与对照组差异不显著($P>0.05$)。实验期间添加 2% 药物组的 ACP 活性一直高于其他各组。

2.2 中草药药浴对刺激隐核虫幼虫的体外杀灭效果

正常有活力的幼虫从包囊破损处释放(图版 I-A), 经中草药药浴处理后死亡的幼虫纤毛停止振动而失去运动能力(图版 I-B)。中草药对刺激隐核虫幼虫存活率的影响如图 5 所示。在 4 h 内, 50 mg/L 浓度对幼虫无致死作用。经浓度为 80 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L 的复方中草药药

浴处理后, 幼虫的存活率分别为 80%、46%、11%、0, 对照组幼虫存活率为 100%。根据以上数据, 使用 SPSS17.0 回归分析方法计算复方中草药“HD-2”对幼虫药浴 4 h 的半致死浓度为 109 mg/L。

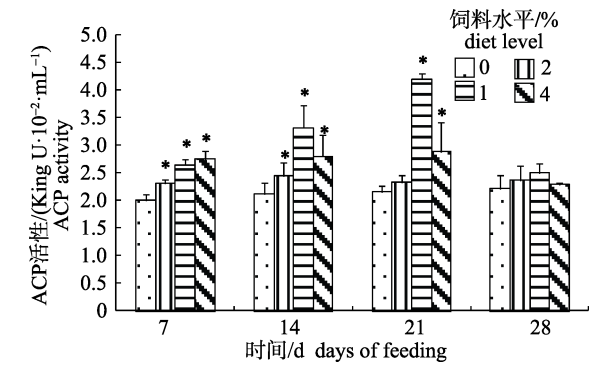
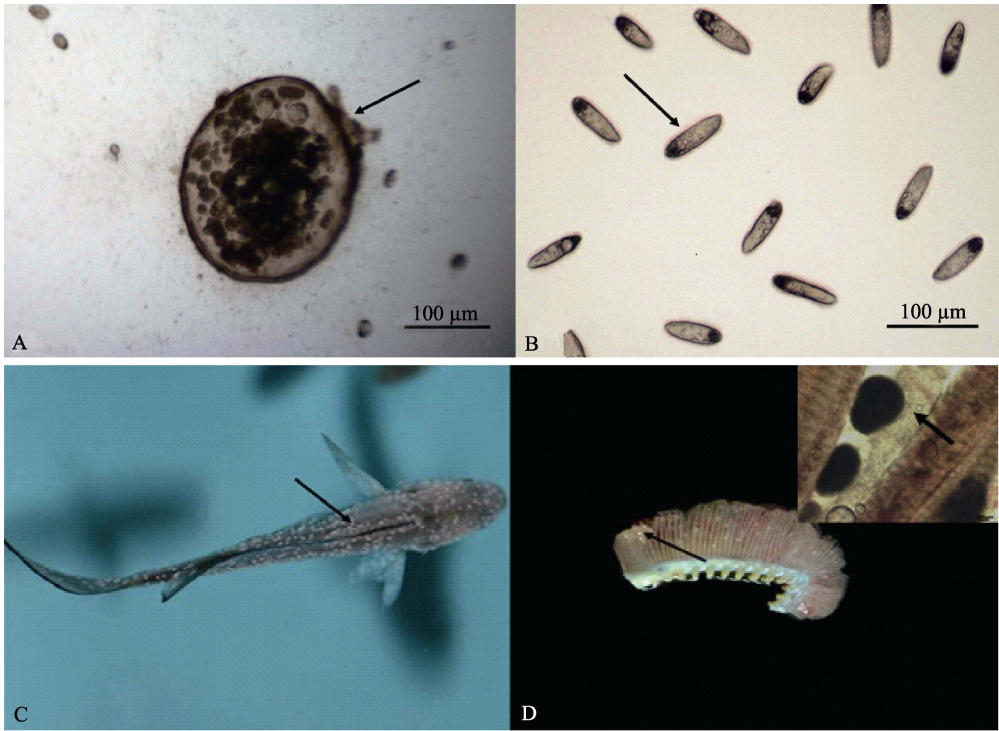


图 4 HD-2 对大黄鱼血清 ACP 活性的影响
“*”表示与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of HD-2 on acid phosphatase activity of *L. crocea*
“*” represents significant difference from control.



图版 I 刺激隐核虫不同重要阶段下的形态特征

A: 从包囊破损处正在释放幼虫(箭头, $\times 40$); B: 中草药处理后死亡的幼虫停止运动, 纤毛停止打动(箭头, $\times 100$); C: 对照组大黄鱼被刺激隐核虫感染后, 体表上可见大量小白点(箭头); D: 对照组鳃丝上可见大量由隐核虫滋养体寄生形成的白点, 造成鳃丝明显充血。右上角显示显微镜下鳃丝内的滋养体(箭头, $\times 40$)。

Plate I Morphological characteristics of *Cryptocaryon irritans* at important stages

A: Several theronts hatched out from a tomont (arrow, $\times 40$); B: The theronts were killed after herbal drug treatment (arrow, $\times 100$). C: There were many white spots on fish body surface after infection by theronts (the control group); D: There were large number of white spots on the gills as the theronts invaded into gills and grew up into trophonts, while the gills appeared the conditions being congested (the control group). Top right displaying the trophonts within gill filaments under light microscope (arrow, $\times 40$).

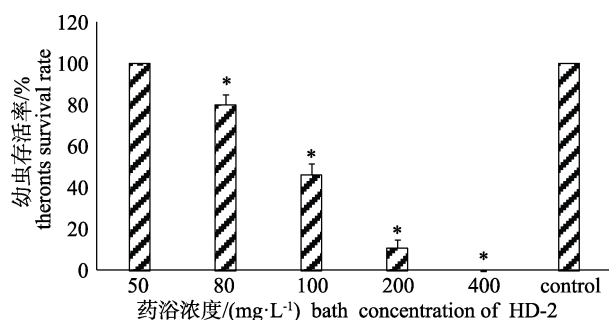


图 5 中草药 HD-2 药浴处理 4 h 对刺激隐核虫幼虫存活率的影响

“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Survival rate of *C. irritans* theronts under the herb compound HD-2 treatment for 4 h

“*” represents significant difference with control ($P<0.05$).

2.3 复方中草药“HD-2”对鱼体上刺激隐核虫滋养体的药浴+口服联合杀灭效果

药物处理 A、B、C 3 个实验组的大黄鱼在实验期间游泳活跃、体色正常、摄食力强,用肉眼观察发现体表有少量白点,鳃丝颜色正常,鳃丝上极少有寄生虫形成的白点。而对照组大黄鱼大部分在玻璃钢桶边缘水面活动,游动缓慢、体色发黑、摄食差,肉眼观察可在体表发现大量由于刺激隐核虫寄生而形成的白点(图版 I-C);掀开鳃盖可见鳃丝充血、出血现象严重,有大量刺激隐核虫滋养体寄生在鳃丝内(图版 I-D)。

各实验组和对照组大黄鱼胸鳍上白点(即刺激隐核虫数目)变化见图 6。药物处理各组胸鳍上刺激隐核虫数目呈减少趋势,对照组呈增加趋势。各药物处理组中,大黄鱼胸鳍上刺激隐核虫数目在药物处理的第 3 天至第 13 天间都明显低于对照组。A、B 兼有药浴的两组大黄鱼胸鳍上白点较少,且无差别;仅实施口服的 C 组大黄鱼胸鳍上白点略多。

各实验组和对照组大黄鱼第二片鳃上白点(即刺激隐核虫的数量)变化情况见图 7。口服至第 6 天,药物处理各组大黄鱼鳃上虫体数量呈显著下降,第 13 天时平均每片鳃丝上仅观察到 1 个虫体,与实验前相比较,虫体数量下降 80%~90%,实验结束时几乎观察不到白点;对照组在未使用药物的情况下,每片鳃丝上从 10 个虫体上升到 159 个,数量增加了近 15 倍。同时发现,实验 13 d 时,对照组虫体数量是用药组的 159 倍。

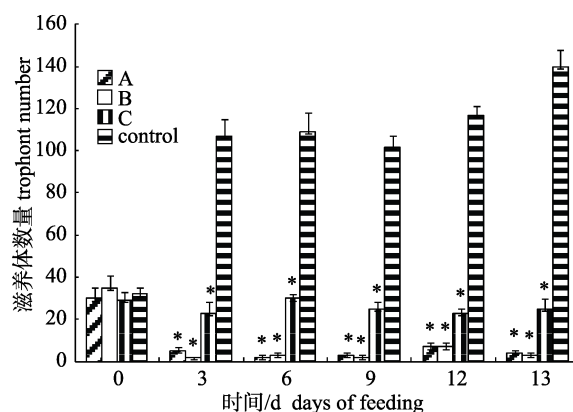


图 6 各实验组大黄鱼胸鳍上滋养体的数量

A: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 100 mg/L; B: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 50 mg/L; C: HD-2 饲料水平 20 mg/kg; control: HD-2 饲料水平 0. “*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Trophont number in fin tissues

A: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 100 mg/L; B: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 50 mg/L; C: HD-2 diet level 20 mg/kg; control: HD-2 diet level 0. “*” represents significant difference with control ($P<0.05$).

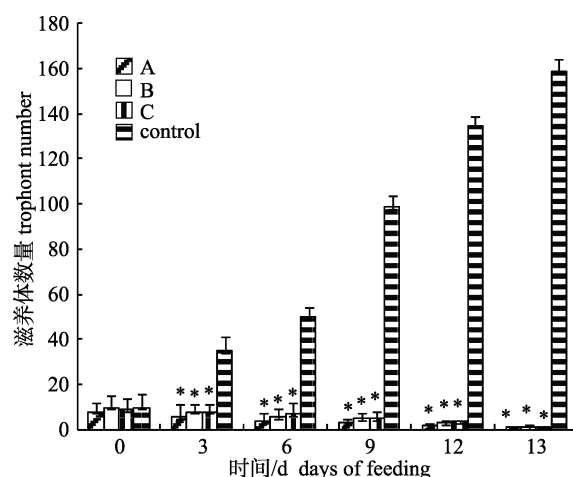


图 7 各实验组大黄鱼鳃上滋养体的数量

A: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 100 mg/L; B: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 50 mg/L; C: HD-2 饲料水平 20 mg/kg; control: HD-2 饲料水平 0. “*”表示与对照组差异显著($P<0.05$).

Fig. 7 Trophont number in gill filament

A: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 100 mg/L; B: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 50 mg/L; C: HD-2 diet level 20 mg/kg; control: HD-2 diet level 0. “*” represents significant difference with control ($P<0.05$).

各实验组和对照组每尾鱼产生掉落池底的包裹数量变化如图 8 所示。药物处理各组的包裹数量在整个实验期间均呈下降趋势,而对照组明显上升。其中 A、B 两组的包裹数量下降明显,实

验结束时A组已收集不到包裹, B组仅收到极少量包裹。实验第12天与对照组相比, 药物处理组A、B、C组包裹数量分别下降100%、91.1%、77.7%。仅口服用药的C组在6d后包裹数量显著下降, 并持续到实验结束。

实验第14天, 各个实验组和对照组大黄鱼的存活率如图9所示。A组3个平行组的存活率均为50%; B组3个平行组的存活率分别为48%、52%、52%; C组3个平行组的存活率为40%、44%、44%、

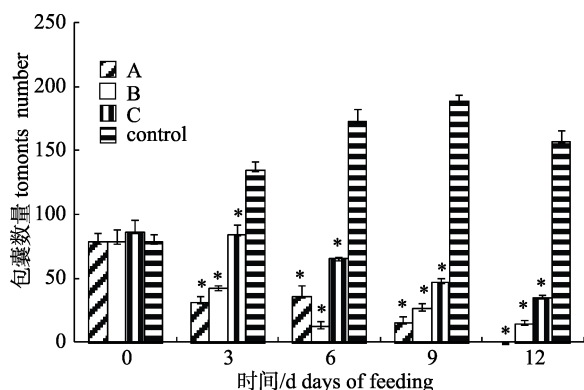


图8 各实验组每尾大黄鱼平均产生的包裹数量
A: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 100 mg/L; B: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 50 mg/L; C: HD-2 饲料水平 20 mg/kg; control: HD-2 饲料水平 0. “*”表示与对照组差异显著($P < 0.05$).

Fig. 8 Average number of fallen cysts from one fish in each treatment group

A: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 100 mg/L;
B: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 50 mg/L;
C: HD-2 diet level 20 mg/kg; control: HD-2 diet level 0.
“*” represents significant difference with control ($P < 0.05$).

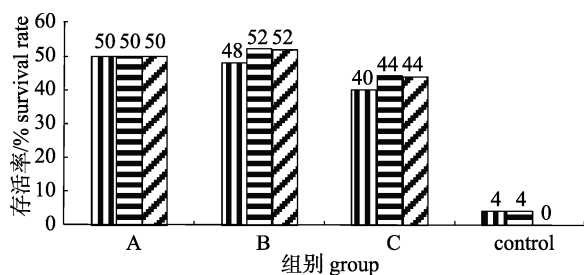


图9 中草药 HD-2 对大黄鱼存活率的影响

A: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 100 mg/L; B: HD-2 饲料水平 20 mg/kg, 药浴浓度 50 mg/L; C: HD-2 饲料水平 20 mg/kg; control: HD-2 饲料水平 0.

Fig. 9 Survival rate of *L. crockery* under the herbal compound HD-2 treatment for 14 d

A: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 100 mg/L;
B: HD-2 diet level 20 mg/kg, bath concentration 50 mg/L;
C: HD-2 diet level 20 mg/kg; control: HD-2 diet level 0.

44%; 对照组 3 个平行组的存活率分别为 4%、4%、0。A、B、C 3 个组与对照组的存活率差异明显。在第 15 天, 对照组全部死亡。

3 讨论

3.1 复方中草药“HD-2”对大黄鱼血清 4 种酶活性的影响

结果表明, 投喂复方中草药 HD-2 可使大黄鱼血清中 LZM、T-SOD、AKP、ACP 活性整体上呈显著上升趋势。投喂中草药 7 d 后酶活力开始升高, 到 14~21 d 时大黄鱼血液中 LZM、T-SOD、AKP、ACP 均达到最高值。连续投喂至 28 d 时出现免疫疲劳, 上述 4 种酶活力开始下降。从药物添加量来看, 添加药物 2% 组 4 种酶活力均高于其他剂量组, 表现出较好效果。

关于鱼、虾方面, 投喂中草药提高免疫酶活力的研究报道较多。李梅芳等^[24]报道投喂中草药可提高大黄鱼 LZM 和 T-SOD 活性, 与本文结果有相似之处。诸多研究结果表明, 中草药可提高其他水生动物 LZM、T-SOD、AKP、ACP 等活性。其中, 李华等^[25]研究报道, 牛膝、板蓝根、甘草等 7 味中药组成的复方中草药能够显著提高大菱鲆血清 LZM 活性, 王荻等^[26]指出贯众也可显著提高施氏鲟的肠、肝等组织的 LZM 活性。黄忠等^[27]、李思明等^[28]分别研究发现投喂中草药可提高凡纳滨对虾 AKP 活性和中华绒螯蟹 ACP 活性。

3.2 复方中草药“HD-2”对刺激隐核虫幼虫存活率的影响

幼虫是刺激隐核虫生活史中感染宿主的关键阶段, 也是危害最严重的阶段^[29]。刺激隐核虫的幼虫营自由生活, 4 h 内的存活率为 100%, 4 h 后开始死亡, 此时对卵形鲳鲅等鱼的感染率仍高达 51.9% 以上^[11]。本研究发现 HD-2 在 4 h 内, 当浓度为 80 mg/L 时即对幼虫有一定杀灭效果, 当药物浓度达到 400 mg/L 时可将刺激隐核虫的幼虫全部杀死, 该药物 4 h 的半致死浓度为 109 mg/L。刘婷婷等^[30]也研究证实, 槟榔在药物浓度为 4550 mg/L 时, 可杀灭刺激隐核虫滋养体和幼虫。相比较而言, 本研究使用的药物是含有槟榔的复

方中草药, 较低浓度即可杀死刺激隐核虫幼虫; 而单方槟榔杀死刺激隐核虫幼虫的浓度相当高。由此说明, 本研究槟榔复方的药效比其槟榔单方好。但学明^[31]研究报道, 福尔马林、盐霉素、硫酸铜分别在 25 $\mu\text{L/L}$ 、15 mg/L 、1.0 mg/L 浓度下能够杀灭刺激隐核虫幼虫。虽然本研究“HD-2”中草药在体外对刺激隐核虫幼虫的杀灭浓度要比这些化学药物高一些, 但具有不易残留, 对鱼体毒副作用低等优点, 可作为防控刺激隐核虫病的安全药物。

3.3 复方中草药“HD-2”对大黄鱼鳃丝及体表刺激隐核虫寄生的影响

黄玮等^[32]研究发现, 刺激隐核虫在鱼类鳃上的寄生位置主要是鳃丝的基底膜, 通常被一层源于上层细胞的薄膜包围, 施用外用药物杀灭的难度很大。刺激隐核虫的大量寄生使鳃丝组织损伤、充血, 破坏了鱼体的呼吸机能, 最终导致被感染的大黄鱼在 1~2 d 内窒息死亡^[29]。实验结果表明, 与实验前相比较, 口服至第 6 天, 药物处理各组大黄鱼鳃上虫体数量呈显著下降, 第 13 天时虫体数量下降 80%~90%; 在实验期 14 d 内, 对照组在未使用药物情况下, 鳃丝上虫体数量增加了 10 多倍; 实验结束时, 对照组虫体数量是用药组的 100 多倍。此外, 实验结果也显示, 各药物处理组大黄鱼胸鳍上隐核虫数目在药物处理的第 3 天至第 13 天间都显著低于对照组。由此说明, 本例中草药通过口服可以良好吸收并经血液流到鳃丝和鳍部组织中, 产生抑虫和杀虫效果。同时发现, 进行药浴+口服的 A、B 两组与仅口服的 C 组之间鳃丝上隐核虫数目没有显著差异。因此, 在养殖生产上可以采用仅口服的用药方式治疗大黄鱼的刺激隐核虫病。

3.4 复方中草药“HD-2”有效抑制隐核虫包囊形成及提高大黄鱼存活率

包囊由刺激隐核虫滋养体离开宿主后形成, 是刺激隐核虫大量增殖时期。包囊的自我保护能力强, 耐受性较好, 难以被药物有效杀死, 是自由生活阶段中最难防控的时期^[15, 32-33]。每年刺激隐核虫病暴发时期都有大量包囊产生, 且刺激隐

核虫病暴发时海水的温度一般在 27℃ 左右, 在此温度下包囊 2 d 内便可孵化成为幼虫^[27], 再次感染养殖鱼类引起更大规模的疾病暴发, 导致鱼类大批死亡。因此, 有效杀灭寄生鱼体的滋养体、抑制包囊的产生, 成为生产中防控刺激隐核虫病的关键环节。Yoshinaga 等^[17]用 200 mg/L 盐霉素钠拌料连续 2 周投喂牙鲆, 检测到的包囊前体和包囊数目减少。Kawano 等^[20]通过每日按鱼体重 50 mg/kg 连续 15 d 投喂磺胺类药物 SDM_X-OMP, 可以降低感染刺激隐核虫真鲷的死亡率。尽管化学药物对刺激隐核虫包囊有抑制效果, 或可以降低鱼类的死亡率但大量使用会造成药物在鱼体内的蓄积, 存在食品安全的隐患。本实验第 12 天与对照组相比药物处理组 A、B、C 3 组包囊数量分别下降 100%、91.1%、77.7%。相应地, 观察大黄鱼平均成活率, 药物处理的 3 个组分别达到了 50%、50.67% 和 42.67%, 而对照组存活率仅为 2.67% (实际上 15 d 全部死亡)。证明 HD-2 对抑制包囊的形成及提高大黄鱼的存活率具有明显作用。

综上所述, 口服和药浴同时进行具有最佳效果, 仅口服中草药亦能达到良好治疗效果。从治疗时间来看, 口服复方中草药 6 d 后大黄鱼胸鳍上、鳃丝上虫体数量和产生的包囊数量都显著下降; 直至 14 d 后胸鳍上、鳃丝上虫体几乎全部死亡。这一结果对开放式的浅海网箱养殖大黄鱼来说是十分重要的, 口服避免了海区网箱中进行药浴造成药物的流失和成本提高。这将预示着仅通过口服药物可减少隐核虫在体表、鱼鳍和鳃丝的寄生虫数量, 也能抑制海区包囊的形成, 进而大大减少开放海区幼虫的数量, 这对减少隐核虫病感染几率和有效防控流行性传播提供了一种实用性且成本低廉的方法。近年来从临床实践来看, 笔者已完成了多批次浅海网箱生产性防治实验, 取得了良好的效果, 证实口服中草药是一种有效的防控途径(另文报道)。从实用性和成本考虑, 建议仅进行口服处理即能保障大黄鱼较高成活率, 中草药添加量为 2%, 投喂时间为 6~14 d。该结果为防控鱼类小瓜虫病提供了理论参考和技术支撑, 在养殖生产中将具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Zhang F, Zhang W B, Mai K S, et al. Effects of Replacement of dietary fish meal by soybean meal on growth, digestive enzyme activity and digestive tract histology of juvenile large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(Sup.): 75–82. [张帆, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中豆粕替代鱼粉对大黄鱼生长、消化酶活性和消化道组织学的影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2012, 42(增刊): 75–82.]
- [2] China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013; 2015: 32. [中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013; 2015: 32.]
- [3] Wang J, Ai Q H, Mai K S, et al. Dietary chromium polynicotinate enhanced growth performance, feed utilization, and resistance to *Cryptocaryon irritans* in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Aquaculture, 2014, 432: 321–326.
- [4] Huang X H, Sun, Z Y, Guo G W, et al. Cloning and characterization of a surface antigen CiSA-32.6 from *Cryptocaryon irritans*[J]. Exp Parasitol, 2012, 130(3): 189–194.
- [5] Wang Y G, Liu Z W, Lin C Y et al. Cryptocaryoniosis in cultured turbot and its treatment[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 1105–1112. [王印庚, 刘志伟, 林春媛, 等. 养殖大菱鲂隐核虫病及其治疗[J]. 水产学报, 2011, 35(7): 1105–1112.]
- [6] Zheng T L, Wang G L, Huang J Q, et al. Studies on pathogen of ulcer disease of cultured large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* and its control medicines[J]. Journal of Zhejiang University, 2006, 33(5): 573–577. [郑天伦, 王国良, 黄家庆, 等. 养殖大黄鱼溃疡病的病原菌及其防治药物[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2006, 33(5): 573–577.]
- [7] Burgess P J, Matthews R A. Fish host range of seven is of lates of *Cryptocaryon irritans* (ciliophora)[J]. J Fish Biol, 1995, 46(4): 727–729.
- [8] Colomi A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of ‘white spot disease’ in marine fish: an update[J]. Aquar Sci Conserv, 1997, 1(4): 217–238.
- [9] Burgess P J. *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (Ciliophora): transmission and immune response in the mullet *Chelon labrosus* (Risso, 1826)[J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 96(2): 354–359.
- [10] Colomi A, Diamant A. Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans*, a ciliate parasite of marine fish[J]. Eur J Protistol, 1993, 29(4): 425–434.
- [11] Dan X M, Li A X, Lin X T, et al. A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*[J]. Aquaculture, 2006, 258(1–4): 127–133.
- [12] Colomi A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*[J]. Dis Aquat Organ, 1985, 1: 19–22.
- [13] Burgess P J, Matthews R A. A standardized method for the in vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host[J]. J Parasitol, 1994, 80(2): 288–292.
- [14] Wang Z H, Zhang C C, Wang Y G, et al. *Cryptocaryoniosis* in cage culture *Pseudosciaena crocea* R and its treatment[J]. Hebei Fisheries, 2013(2): 29–34. [王忠华, 张辰仓, 王印庚, 等. 网箱养殖大黄鱼刺激隐核虫病及治疗[J]. 河北渔业, 2013(2): 29–34.]
- [15] Xu R L, Jiang J B, Chen B S. Light microscopy observation on the life cycle of the *Cryptocaryon irritans*[J]. Marine Sciences, 1992, 16(3): 42–44. [徐润林, 江静波, 陈毕生. 刺激隐核虫生活史的光镜观察[J]. 海洋科学, 1992, 16(3): 42–44.]
- [16] Dan X M, Zhang T W, Li Y W, et al. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(3): 885–891.
- [17] Yoshinaga T, Im H J, Nishida S, et al. In vitro and in vivo efficacies of ionophores against *Cryptocaryon irritans*[J]. Aquaculture, 2011, 321(3–4): 167–172.
- [18] Hirazawa N, Goto T, Shirasu K. Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts[J]. Aquaculture, 2003, 223(1–4): 1–13.
- [19] Zheng X Y, Liu S, Zhou M X, et al. Influence of environmental factors and chemotherapeutants on *Cryptocaryon irritans* tomtont and theront[J]. Journal of Ningbo University: Natural Science & Engineering Edition, 2015, 28(1): 15–20. [郑晓叶, 刘顺, 周旻曦, 等. 几种理化因子对刺激隐核虫包囊及幼虫活力的影响[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2015, 28(1): 15–20.]
- [20] Kawano F, Hirazawa N, Gravningen K, et al. Antiparasitic effect of dietary Romet®30 (SDMX-OMP) against ciliate *Cryptocaryon irritans* infection in the red sea bream *Pagrus major* and tiger puffer *Takifugu rubripes*[J]. Aquaculture, 2012, 344–349: 35–39.
- [21] Hu L J, Zhu S S, Zhang X F, et al. Research progress of chinese herbal medicine prevention and control of parasitic diseases[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(9): 66–69. [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[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(9): 66–69.]

- [22] Chu C, Zhang Q Z, Luo F. Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(1): 55–60. [鉏超, 张其中, 罗芬. 20 种中草药杀灭离体小瓜虫的药效研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(1): 55–60.]
- [23] Shan X F, Meng Q F, Kang Y H, et al. Isolation of active compounds from methanol extracts of *toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Vet Parasitol, 2014, 199(3–4): 250–254.
- [24] Li M F, Zhang W J, Mao Z J, et al. Influence of oral administration of Chinese herbal medicines on activity of several immunity related enzymes from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Fisheries Science, 2014, 35(11): 718–722. [李梅芳, 张文杰, 毛芝娟, 等. 投喂中草药对大黄鱼几种免疫酶活性的影响[J]. 水产科学, 2014, 35(11): 718–722.]
- [25] Li H, Zhang T E, Li Q. Influence of compound Chinese herbal medicine on non-specific immunity of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(2): 115–120. [李华, 张太娥, 李强. 复方中草药对大菱鲆非特异性免疫力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(2): 115–120.]
- [26] Wang D, Liu H B. Effects of Chinese medicinal herb complex additives on non-specific immunity of Amur sturgeon (*Acipenser schrencki* Brandt)[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(2): 249–254. [王荻, 刘红柏. 中草药方剂对施氏鲟非特异性免疫功能的影响[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(2): 249–254.]
- [27] Huang Z, Lin H Z, Li Z J, et al. Effects of feeding strategy of dietary Chinese herbs on growth performance, digestive enzymes and non-specific immunity of *Litopennaeus vannamei*[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(5): 37–43. [黄忠, 林黑着, 李卓佳, 等. 复方中草药投喂策略对凡纳滨对虾生长、消化及非特异性免疫功能的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 37–43.]
- [28] Li S M, Ding H J, Guo X Z, et al. Effects of a Chinese herbal compound on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fisheries Science, 2015, 34(4): 201–207. [李思明, 丁惠君, 郭小泽, 等. 复方中草药对中华绒螯蟹生长、非特异性免疫和抗病力的影响[J]. 水产科学, 2015, 34(4): 201–207.]
- [29] Liu Z Y, Xie Y Q, Lin X J, et al. Research on the Cryptocaryoniosis of marine fishes from the perspective of epidemiology in Ningde of Fujian[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2014, 36(5): 351–357. [刘振勇, 谢友佳, 林小金, 等. 福建宁德海水鱼类刺激隐核虫病流行病学研究[J]. 福建水产, 2014, 36(5): 351–357.]
- [30] Liu T T, Tang X Q, Zhou L. 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[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 113–120. [刘婷婷, 唐小千, 周丽. 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[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 113–120.]
- [31] Dan X M. The propagation, preservation of *Cryptocaryon irritans* brown 1951, and control of cryptocaryoniosis[D]. Guangzhou: Jinan University, 2006. [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[D]. 广州: 暨南大学, 2006.]
- [32] Huang W, Ma Y, Li A X, et al. Ultrastructural study on *Cryptocaryon irritans* throughout the life cycle of artificially infecting *Trachinotus blochi*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(5): 635–642. [黄玮, 马跃, 李安兴. 人工感染的刺激隐核虫各期虫体的超微结构[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 635–642.]
- [33] Li R J, Dan X M, Li A X. *Siganus oramin* recombinant L-amino acid oxidase is lethal to *Cryptocaryon irritans*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(6): 1867–1873.

Effects of a Chinese herbal compound on non-specific immune activities and extermination of parasite *Cryptocaryon irritans* in *Larimichthys crocea*

CUI Xiaocui^{1,2}, WANG Yingeng², CHEN Xia³, ZHANG Zheng², LI Bin², KE Qiaozhen⁴, CHANG Yaqing¹

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China;

3. Qingdao Sunny Ocean Aquatic Technology Co. Ltd., Qingdao 266071, China;

4. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Fujian Fuding Seagull Fishing Food Co. Ltd., Ningde 352103, China

Abstract: Cryptocarioniasis, which is caused by *Cryptocaryon irritans*, is difficult to control in cultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* and dozens of other marine fish species and is seriously threatening development of the aquaculture industry. To investigate the effects of the Chinese herbal compound (HD-2) [*Areca catechu* L, *Melia toosendan* Sieb. et Zucc, *Dryopteris crassirhizoma*, *Folium isatidis*, and *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees] for treating cryptocarioniasis, *L. crocea* were collected and fed different doses of HD-2 to compare changes in non-specific immune indices, such as lysozyme (LZM), total superoxide dismutase (T-SOD), alkaline phosphatase (AKP), and acidic phosphatase (ACP) activities. The results showed that HD-2 promoted LZM, T-SOD, AKP, and ACP activities, and maximum activities were observed 14–21 d after feeding 2% HD-2. No *C. irritans* theronts were killed in 50 mg/L HD-2 within 4 h *in vitro*. However, 20%, 54%, and 89% of the theronts were killed at concentrations of 80 mg/L, 100 mg/L, and 200 mg/L HD-2, respectively; all theronts were killed by 400 mg/L HD-2. The median lethal concentration for 50% (LC₅₀) of the theronts was 109 mg/L. A 15-d indoor therapeutic experiment was performed in which fish were assigned randomly into groups A–C and a control. Fish in group A had a survival rate of 50% after being fed 20 g/kg HD-2 in feed and dipped in a 100 mg/L HD-2 bath. Fish in group B had a survival rate of 50.67% after being fed 20 g/kg HD-2 in feed and dipped in a 50 mg/L HD-2 bath. Fish in group C achieved a survival rate of 42.67% after being fed 20 g/kg HD-2 in feed. The survival rates of the three treatment groups were significantly higher than that of the control group (2.67%). The number of trophonts on the pectoral fins of *L. crocea* was significantly lower than that in the control group. The number of trophonts on *L. crocea* gill filaments declined during the three treatments. In contrast, the number of trophonts in the control group increased significantly, whereas the number of tomonts in the treated groups decreased significantly. The numbers of tomonts in groups A, B, and C decreased by 100%, 91.1%, and 77.7%, respectively, on day 12 and were significantly different from those in the control group. In conclusion, simultaneous oral administration and a medicated bath in HD-2 was the most efficacious treatment for cryptocarioniasis. The 2% HD-2 oral treatment added to feed for 6–14 d is recommended to guarantee higher survival rates of *L. crocea* based on availability and cost considerations. These results provide a theoretical reference and technical support for preventing and controlling cryptocarioniasis, and will be useful for fish culture in future.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Cryptocaryon irritans*; non-specific immunity; tomont; trophont; Chinese herb; LC₅₀

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn