

贪食迈阿密虫的体外培养及有效抗虫药物筛选

刘璐, 韦昊麟, 王国良, 蒋霞敏, 周素明, 陶震*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 贪食迈阿密虫(*Miamiensis avidus*)是一种已知的养殖鱼类兼性寄生虫, 可严重危害养殖水产动物的健康并导致死亡。为了研究有效的贪食迈阿密虫防治方法, 以从虎斑乌贼溃疡病患处分离的一株贪食迈阿密虫(SP-1株)为实验对象, 设计了一种贪食迈阿密虫的体外培养方法, 结果显示在最适生长温度为 20℃, 培养至稳定期时虫体密度可达 1×10^5 个·mL⁻¹。采用体外浸浴模型分析了阿苯达唑、盐酸强力霉素、甲硝唑、硫酸奎宁、盐酸左旋咪唑、福尔马林和双氧水等药物对 SP-1 株的杀灭效果。结果表明, SP-1 株对硫酸奎宁、盐酸左旋咪唑的敏感性较高, 24 h 浸浴最小致死质量浓度分别为 12.5 μg·mL⁻¹ 和 25 μg·mL⁻¹; 体积浓度为 50 μL·L⁻¹ 的福尔马林溶液或双氧水均可在 1 h 内完全杀灭暴露在其中的 SP-1 株。

关键词: 贪食迈阿密虫; 体外培养; 抗虫药物

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 02-0011-04

贪食迈阿密虫(*Miamiensis avidus*)属于盾纤目(Scuticociliatida)、嗜污科(Philasteridae)、迈阿密虫属(*Miamiensis*)的纤毛虫, 可在鱼体内外栖生或行兼性寄生。最早由 Thompson 及 Moewus 发现并鉴定^[1]。国内外已有的报道表明^[2-4], 贪食迈阿密虫能寄生于多种海水养殖鱼类, 尤其危害养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鱼类健康, 严重时可导致鱼体死亡, 造成严重的经济损失。

本研究在养殖的虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)中发现有大量贪食迈阿密虫感染, 其主要症状为体外寄生, 引起体表皮肤溃疡^[5], 造成养殖乌贼死亡。因此, 针对贪食迈阿密虫感染的防治方法研究在水产养殖中具有重要意义。

目前, 在水生动物寄生虫的防治中, 化学药物治疗仍是最有效的方法。本研究以贪食迈阿密虫株(SP-1)为研究对象, 旨在建立贪食迈阿密的体外培养方法及评价抗虫药效的体外浸浴模型, 并通过该模型比较常见的 5 种抗虫药和 2 种消毒剂的杀(抗)虫效果。寄生虫的体外培养结合药物浸浴模型

可快速实现药效评价, 为进一步筛选适合水产养殖中应用的抗虫药物提供参考。

1 材料与方法

本研究中采用的贪食迈阿密虫 SP-1 株, 由宁波大学海洋学院水产养殖病害研究室在养殖虎斑乌贼皮肤溃疡组织中分离获得, 并已进行鉴定^[5]。

1.1 贪食迈阿密虫体外培养方法

1.1.1 实验材料

贪食迈阿密虫 SP-1 株体外培养所采用的培养液以 L-15 培养基(Hyclone 公司)为基础, 添加 5% 体积的胎牛血清(FBS, Gibco 公司)、5% 体积的灭菌酵母提取物(Oxid 公司)溶液(1 g·mL⁻¹)。贪食迈阿密虫的培养在 25 cm² 透气的细胞培养瓶(BD 公司)中进行。

1.1.2 实验方法

每个培养瓶中加入 5 mL 改良 L-15 培养基, 虫体的初始密度为 5×10^2 个·mL⁻¹。从患病动物上分离的原代纤毛虫培养时额外添加 5×青链霉素双抗溶液(Hyclone 公司), 以抑制细菌大量繁殖; 无菌培

收稿日期: 2016-10-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省重中之重学科开放基金(xkzsc1403); 宁波市农业科技专项(2014C11001)。

第一作者: 刘璐(1992-), 女, 河北定州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防控。E-mail: 719155053@qq.com

*通信作者: 陶震(1985-), 男, 浙江金华人, 讲师, 主要研究方向: 水产动物病害防控。E-mail: taozhen@nbu.edu.cn

养传代后将不再添加抗生素(贪食迈阿密虫在自然环境中可摄食细菌等微生物个体). 培养温度包括 10、20、30、40 °C, 连续培养 5 d, 每隔 24 h 取样计算培养液中虫体密度, 绘制生长曲线, 进而确定其最适生长温度.

虫体计数采用 Parama 等^[6]描述的方法: 取 100 μL 待检虫体悬液, 与 100 μL 的 0.5% 戊二醛溶液混合, 室温静置 10 min 灭活虫体. 高密度重悬使用血球计数板在显微镜下计数; 低浓度则将灭活悬液稀释 10 或 100 倍后取 10 μL 在 200 $\times$ 或 400 $\times$ 显微镜放大倍数下计数, 重复 3 次.

1.2 药物浸浴模型建立

1.2.1 实验药物

实验中使用的标准化学药物有: 阿苯达唑(粉剂纯度 $\geq 98\%$, 商品编号: A131023)、甲硝唑(粉剂纯度 $\geq 99\%$, 商品编号: M109874)、盐酸强力霉素(粉剂, 商品编号: D111942)、硫酸奎宁(粉剂纯度 98%, 商品编号: Q110175)、盐酸左旋咪唑(粉剂纯度 99%, 商品编号: L118865)、双氧水(溶液浓度 30%, 商品编号: H112515)以及甲醛溶液(溶液浓度 37%). 除甲醛由国药集团化学试剂有限公司生产外, 其他药物均由阿拉丁试剂公司(上海)生产.

1.2.2 实验方法

分别将阿苯达唑、盐酸强力霉素、甲硝唑、硫酸奎宁、盐酸左旋咪唑溶于过滤除菌的海水(盐度 25‰), 配置 2 倍梯度稀释的系列溶液, 质量浓度依次为 111.1、55.6、27.8、13.9、6.9、3.5、1.7、0.9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 取培养至指数生长期末期(约 4 d)的虫体培养液, 在室温条件下以 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 后将虫体重悬在过滤除菌的海水中(盐度调节至 25‰), 密度调整至 1×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$. 在 96 孔板各孔中加入上述密度为 1×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 虫悬液 10 μL , 同时按梯度依次在不同孔中加入各浓度的药物溶液 90 μL , 混匀后形成含梯度药物浓度为 100.0、50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的虫悬液, 置于 20 °C 孵育, 药物处理 24 h, 将 96 孔板放置在倒置显微镜上镜检各孔贪食迈阿密虫的存活情况. 贪食迈阿密虫若满足以下任意一项标准, 即判为死亡: (1) 虫体整体结构失去完整性; (2) 虫体及其体表的纤毛均处于静止状态. 每种药物的每个浓度均设置 3 个平行组, 相同浓度下所有

平行组均出现虫体全部死亡, 则判断此药物浓度杀虫率为 100%. 同时设置对照组(不含化学药物的海水虫悬液).

此外, 试验还采用同样方法测试液体消毒剂福尔马林和过氧化氢的体外浸浴杀虫效果. 药物使用除菌海水稀释, 浓度梯度包括 400、200、100、50 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (使用无菌海水稀释). 在虫体的体外浸浴试验中, 每隔 1 h 观察记录 96 孔板内贪食迈阿密虫的存活情况一次, 直至 3 h 或纤毛虫全部死亡. 实验结果反映贪食迈阿密虫对各类化学药物的敏感性以及有效化学药物的最小致死浓度(MLC).

2 结果

2.1 不同温度条件下贪食迈阿密虫体外培养的生长曲线

实验结果表明, 本实验设计的培养液适合贪食迈阿密虫的体外培养, 其最适生长温度为 20 °C, 培养至稳定期时虫体密度可达 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$. 不同培养温度下贪食迈阿密虫 SP-1 株的生长曲线如图 1 所示.

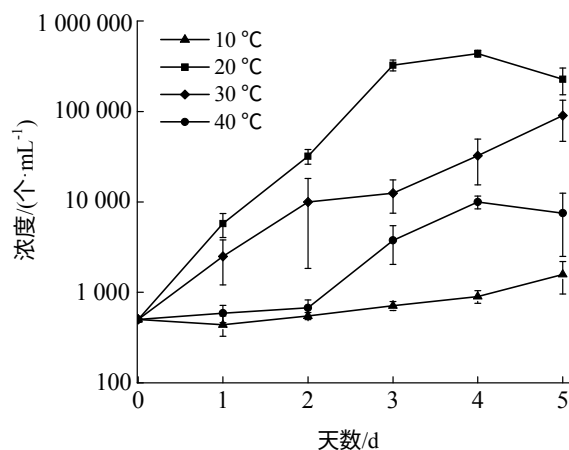


图 1 不同温度条件下贪食迈阿密虫 SP-1 株的体外培养生长曲线

2.2 药物浸浴模型结果

药物试验结果显示, 在 5 种测试的抗寄生虫药物中, 有 3 种药物在试验选择的药物浓度范围内浸浴 24 h 后能 100% 杀灭贪食迈阿密虫(表 1), 而各空白对照组未发现或极少数符合上述死亡的标准虫体(参见 1.1.2 节). 各有效药物的 MLC 浓度范围在 12.5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 其中硫酸奎宁 MLC(浸浴 24 h)最低, 为 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 福尔马林和过氧化

氢 2 种液体的体表消毒液, 在最低浓度 $50\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浸浴浓度条件下处理 1 h 后, 贪食迈阿密虫菌死亡率均达到 100%, 对照组正常.

表 1 药物体外浸浴作用 24 h 后贪食迈阿密虫的死亡情况

药品名称	药物质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$							
	100.0	50.0	25.0	12.5	6.3	3.1	1.5	0.7
阿苯达唑	—	+	+	+	+	+	+	+
盐酸强力霉素	+	+	+	+	+	+	+	+
甲硝唑	+	+	+	+	+	+	+	+
硫酸奎宁	—	—	—	—	+	+	+	+
盐酸左旋咪唑	—	—	—	+	+	+	+	+

注: “+”表示在此药物浓度处理 24 h 后尚有贪食迈阿密虫体存活;
“—”则表示在此药物浓度处理 24 h 后所有虫体完全死亡.

3 讨论

自 1964 年贪食迈阿密虫首次在美国迈阿密海湾栖息的海马(*Hippocampus* sp.)体内发现并报道以来, 已有多个研究显示贪食迈阿密虫能直接侵入养殖牙鲆等鱼体组织, 包括体表皮肤、鳃组织、消化系统以及深层肌肉组织及神经系统等. 病鱼临床症状包括体色发黑、鳞片脱落、表皮溃疡和肠炎等^[2,7-8]. 人工感染实验观察结果显示, 贪食迈阿密虫能以鼻腔和眼眶等作为入侵途径进入鱼体内部组织, 并发展成系统性感染^[9]. 因贪食迈阿密虫主要营腐生或兼性寄生的生活方式, 可能会导致其对水产养殖动物危害性高于自然水体中的野生动物. 首先, 水产养殖动物通常限制在相对有限的固定空间内(如土塘、水泥池和网箱等), 且养殖密度相对较高. 其次, 养殖设施周围的有机质的积累(养殖过程残饵粪便等)可能促进营腐生生活的纤毛虫的生长. 若养殖设施内引入贪食迈阿密虫等兼性寄生虫后, 一旦部分养殖动物个体发生了感染情况, 缺少有效的防控措施则会暴发贪食迈阿密虫等鱼类寄生虫的大规模感染. 去年养殖虎斑乌贼爆发大规模的皮肤溃疡病, 患病乌贼体表以及鳍出现不同程度的溃疡症状, 我们对其溃疡处取样进行病理研究时发现大量贪食迈阿密虫的存在^[5]. 因此在养殖过程中, 需要加强对水体的消毒处理以及寄生虫的定时检测, 发现病鱼及时治疗及预防新的感染. 目前, 化学药物仍是应对鱼类寄生虫感染的有效途径, 因此筛选有效的化学药

物是防治环节中重要的组成部分.

体外培养实验显示, 贪食迈阿密虫可通过二分裂繁殖, 而且繁殖速度较快, 因此药物浓度必须足以杀灭所有虫体, 排除感染在鱼群中复发可能性. 本研究表明, 奎宁类药物(硫酸奎宁)和盐酸左旋咪唑 2 种抗虫药能在体外以低质量浓度(分别 12.5 和 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)100%杀灭实验中的贪食迈阿密虫. 奎宁俗称金鸡纳霜, 茜草科植物金鸡纳树及其同属植物的树皮中的主要生物碱, 属常见的抗寄生虫虫药物, 也常用于水产养殖中鱼类寄生虫的防治^[10]. 盐酸左旋咪唑别名 L-2,3,5,6-四氢-6-苯基咪唑^[2,1-6]噻唑盐酸盐, 属于常见的抗寄生虫药物, 对蛔虫、钩虫、蛲虫和粪类圆线虫病有较好疗效. 两者均不属禁用渔药, 可应用于水产养殖过程. 另外, 实验还发现, 低体积浓度福尔马林和双氧水对贪食迈阿密虫具有很好的杀灭作用, 可用于养殖动物的体表杀虫或养殖设施表面处理等.

水产养殖动物的纤毛类寄生虫多属于兼性寄生, 可在合适的培养基中成功体外连续培养, 可用于药物筛选及其他相关研究. 我们设计的这种适合纤毛虫的体外培养基, 成功地培养了从养殖乌贼溃疡中分离得到的贪食迈阿密虫, 并通过浸浴药物模式筛选出 2 种抗贪食迈阿密虫的化学药物和 2 种体外消毒剂, 确立了有效的药物浓度, 为进一步的药物临床试验和水产养殖中纤毛虫类寄生虫的防治提供科学依据.

参考文献:

[1] THOMPSON J C, MOEWUS L. *Miamiensis avidus* ng, n. sp., a marine facultative parasite in the ciliate order Hymenostomatida[J]. The Journal of Protozoology, 1964, 11(3):378-381.

[2] SONG J Y, KITAMURA S I, OH M J, et al. Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida) [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 83(2):133-143.

[3] JUNG S J, WOO P T K, BUCHMANN K, et al. Fish Parasites: Pathobiology and Protection [M]. London: CAB International, 2012:73-91.

[4] 赵研, 范鑫鹏, 许媛, 等. 八种海洋盾纤类纤毛虫的形态学研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6):929-939.

[5] TAO Z, LIU L, CHEN X, et al. First isolation of

- Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) associated with skin ulcers from reared pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 122(1):67-71.
- [6] PARAMA A, IGLESIAS R, ÁLVAREZ M, et al. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): Experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture, 2003, 217(1):73-80.
- [7] JUNG S J, KITAMURA S I, SONG J Y, et al. *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 73(3):227-234.
- [8] TAKAGISHI N, YOSHINAGA T, OGAWA K. Effect of hyposalinity on the infection and pathogenicity of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 86(2):175-179.
- [9] MOUSTAFA E M M, TANGE N, SHIMADA A, et al. Experimental scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Miamiensis avidus*: pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2010, 72(12):1557-1563.
- [10] 王孟华. 牙鲆幼鱼盾纤毛虫病药物防治初步试验[J]. 水产养殖, 2012, 33(2):49-51.

In vitro culture of fish pathogen *Miamiensis avidus* and screening of effective antiprotozoals

LIU Lu, WEI Hao-lin, WANG Guo-liang, JIANG Xia-min, ZHOU Su-ming, TAO Zhen^{*}
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Miamiensis avidus* is a known facultative fish parasite. This histophagous ciliate has been reported to infest several mariculture fish and cause a high mortality level. In the present study, we successfully cultured a *M. avidus* strain SP-1 isolated from skin ulcers of a captive *Sepia pharaonis*. The results of culture experiments showed that the optimal growth temperature was 20 °C and the ciliate was able to grow to 10^5 cells·mL⁻¹ in the medium. To develop prophylactic strategies for *M. avidus* infections, seven candidate antiprotozoals were screened for activity against this pathogen *in vitro*. Five of these were found potent in the antiprotozoal effect measured by quinine sulfate (24-h minimum lethal concentration; MLC-24=12.5 mg·L⁻¹), levamisole hydrochloride (MLC-24=25.0 mg·L⁻¹), albendazole (MLC-24=100.0 mg·L⁻¹), hydrogen peroxide (1-h lethal concentration MLC-1=50.0 mg·L⁻¹) and formalin (MLC-1=50.0 mg·L⁻¹). Our findings provide supporting evidence about parasitic ciliate infection prevention in aquaculture.

Key words: *Miamiensis avidus*; *in vitro* culture; temperature; antiprotozoal drug

(责任编辑 史小丽)