

中华湖蛭的鉴定及药物浸浴杀灭效果研究

胡金春^{1,2}, 叶嘉政¹, 任思齐¹, 郑善坚^{1*}

(1. 浙江师范大学/浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 浙江金华 321004; 2. 浙江省衢州市水产技术推广中心, 浙江衢州 324000)

摘要 首次报道了一种寄生于天然水体鲢、鳙鱼鳃部的中华湖蛭(*Limnotrachelobdella sinensis*)。2019—2022年, 每年10月份后在部分水库鲢、鳙鱼鳃上发现少量幼虫感染, 翌年4—6月为感染高峰, 7月份后自行脱落消失。它吸食鱼鳃上的血液, 严重影响鱼体生长及市场销售价格, 给渔业生产带来巨大的经济损失。经形态学与分子生物学鉴定其为中华湖蛭。利用几种常用药物(敌百虫、川楝子、生石灰、硫酸铜)对中华湖蛭进行离体和在体(寄生在鲢鱼鳃上)的浸浴杀灭效果试验。离体试验结果表明, 生石灰 200 mg/L、川楝子 400.00 mg/L、敌百虫 4.00 mg/L 浸浴 1 h 可以全部杀灭中华湖蛭; 在体试验表明, 400.00 mg/L 川楝子、2.00 mg/L 敌百虫、100.00 mg/L 生石灰浸浴 1 h 后捞出至清水中暂养 24 h 观察, 虫体全部死亡脱落而鲢鱼安全。

关键词 中华湖蛭; 浸浴; 杀灭效果; 离体试验; 在体试验

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)24-0082-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.24.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Identification of *Limnotrachelobdella sinensis* and the Germicidal Efficacy of Drug Immersion Bath

HU Jin-chun^{1,2}, YE Jia-zheng¹, REN Si-qi¹ et al (1. Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province/Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; 2. Aquatic Technology Promotion Station in Quzhou City, Quzhou, Zhejiang 324000)

Abstract *Limnotrachelobdella sinensis*, a freshwater leech parasitic on the gills of *Aristichthys nobilis* and *Hypophthalmichthys molitrix* in natural water body, was reported for the first time. During 2019–2022, a small number of larvae were found to be infected on the gills of *A. nobilis* and *H. molitrix* in some reservoirs after October each year. The infection peaked from April to June in the following year, and then disappeared after July. It absorbed the blood on the fish gills, which seriously affected the fish growth and market sales price, and brought huge economic losses to the fishery production. It was identified by morphology and molecule methods as *L. sinensis*. The killing effect of several commonly-used drugs (trichlorfon, toosendan, quicklime and cupric sulfate) on *L. sinensis* was tested by dipping bath *in vitro* and *in vivo* (parasitized on the gills of *H. molitrix*). The *in vitro* test showed that soaking with 200.00 mg/L quicklime, 400.00 mg/L toosendan and 4.00 mg/L trichlorfon for 1 hour could kill all *L. sinensis*, while *in vivo* test showed that 400.00 mg/L toosendan, 2.00 mg/L trichlorfon and 100.00 mg/L quicklime were soaked for 1 hour and then temporarily cultured in clean water, and all the parasites were killed for 24 hours and *H. molitrix* was safe.

Key words *Limnotrachelobdella sinensis*; Immersion bath; Germicidal efficacy; *In vitro* test; *In vivo* test

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)是典型的浮游生物食性鱼类,在我国主要的大型水库、湖泊中具有重要的生态学意义。随着“洁水渔业”的发展,我国水库湖泊都以放养鲢鳙鱼为主,一方面鲢、鳙鱼通过非经典生物操纵控制藻类水华的发生^[1],另一方面水库等清水养殖的鲢鳙鱼品质较好,能带来较大的经济效益,形成了以千岛湖有机鱼等品牌为代表的特色产业,深受市场喜爱。自2019年以来,浙江省部分中小型水库陆续发现鳙、鲢鱼鳃上感染类似中华湖蛭(*Limnotrachelobdella sinensis*)的寄生虫,其他鱼类上未发生感染。3月上旬在大规格鳙、鲢鱼鳃上可见少量白色幼虫感染,4—7月发现大量感染,特别是对鳙鱼的感染率极高,每条鱼上可见30~50条褐色成虫,虽然不会引起死亡,但会影响其销售,造成了较大的经济损失。

目前已知中华湖蛭在我国山东、江苏、湖南和黑龙江地区广泛分布,主要利用其强力的尾吸盘吸附于鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)鱼鳃盖骨上,头部和身体的前段游离在鳃腔里面,通过吻在鳃瓣上吮吸血液^[2]。另外,水库等大型水体鱼类感染中华湖蛭缺乏有效的防控措施,存在用药成本大、生态风险高的问题,考虑到其死亡率不高,笔者

认为比较经济的措施是在鲢鳙鱼起捕后采用药物短期浸浴杀灭虫体。笔者开展药物浸浴对中华湖蛭的杀灭效果试验,以期为大型水体鲢鳙鱼中华湖蛭的安全有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 2020年6月从活体鳙鱼鳃部采集到体长(45±5)mm、体宽(15±5)mm的鱼蛭(暂命名为JH20200616)500多条,用于鉴定及药物杀灭效果试验。另外,从该水库选择鳃部感染中华湖蛭数量相近[(20±2)条]、规格(3±1)kg/尾的鲢鱼150尾,暂养在实验室养殖桶内。试验用水为经曝气24h以上的自来水,试验期间保持曝气, pH为6.7~7.2,溶解氧7.5~9.0 mg/L,水温23.5~25.5℃。

1.2 试验药物 选择4种常用杀虫药物用于试验,敌百虫(含量≥90%,南通江山农药化工股份有限公司);五水硫酸铜(含量≥98%,国药集团化学试剂有限公司);生石灰、川楝子均购自当地市场。其中,川楝子研磨成粉,称取2g药粉,加入400mL蒸馏水经文火煎煮1h,冷却后经多层灭菌筛绢网过滤,再用灭菌水定量,调制成为1g/L的母液,5~7℃下放置备用。

1.3 试验方法

1.3.1 形态与分子生物学鉴定。取寄生虫活体将其置于培养皿中,在蔡司体视显微镜(BHCS-LT004)下观察,进行拍照和测量,并描述其外部形态特征。使用动物基因组DNA抽

基金项目 浙江省重点研发计划项目(2019C02049, 2020C02014)。

作者简介 胡金春(1969—),男,浙江龙游人,高级工程师,硕士,从事水生动物养殖及技术推广研究。*通信作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事水生动物养殖及病害防控研究。

收稿日期 2022-11-18

提试剂盒提取寄生虫 DNA, 查阅文献设计下列引物扩增其 *COI* 序列^[3]。

F_1 为 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', R_1 为 5'-TAAACTTCAGGGTGACCCAAAAAATCA-3'。

25 μ L 反应体系: ddH₂O 12 μ L, *Taq* 酶 10 μ L, 正、反向引物和模板 DNA 各 1 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

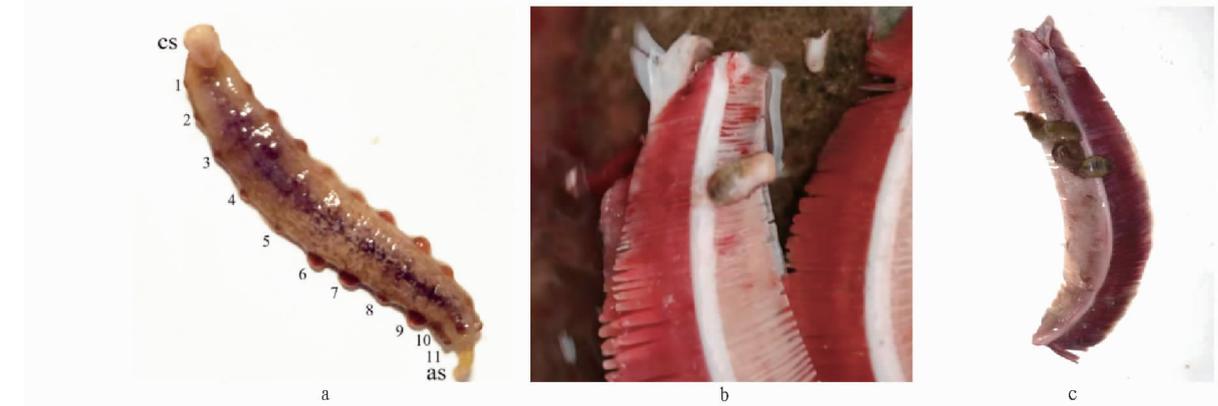
PCR 扩增完成后, 取 5 μ L PCR 扩增产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果通过 NCBI 网站在线 Blast 数据库进行序列同源性比较, 并通过 Mega 4.0 软件构建系统发育树。

1.3.2 离体条件下药物对中华湖蛭成虫的杀灭效果试验。 根据预试验结果, 每种药物配制 5 个药物浓度梯度^[4](表 1) 置于烧杯中, 每个试验烧杯中分别放入中华湖蛭 10 条, 每组设 3 个重复。药物浸浴 1 h 后, 观察并记录中华湖蛭死亡情况, 死亡判断标准为中华湖蛭身体伸长、针刺无反应。

表 1 试验药物浓度梯度的设置

Table 1 The concentration gradients setting of test drugs

药物名称 Name of insecticides	药物质量浓度 Mass concentration of insecticides//mg/L				
	I	II	III	IV	V
生石灰 Quicklime	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
硫酸铜 Cupric sulfate	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
川楝子 Toosendan	25.00	50.00	100.00	200.00	400.00
敌百虫 Trichlorfon	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00



注: a 为中华湖蛭成虫; b、c 为寄生鱼鳃部; as 为前吸盘; cs 为尾吸盘; 1~11 为搏动囊。

Note: a. Adult of *L. sinensis*; b and c. The parasitic fish gills; as. Anterior sucker; cs. Caudal sucker; 1-11. Pulsating sac.

图 1 中华湖蛭的形态特征

Fig.1 The morphological characteristics of *L. sinensis*

2.2 离体条件下药物对中华湖蛭的杀灭效果 选择 4 种常用渔药进行离体条件下对中华湖蛭的杀灭效果试验。结果表明, 生石灰 200.00 mg/L、川楝子 400.00 mg/L、敌百虫 4.00 mg/L 浸浴 1 h 可以全部杀灭中华湖蛭(图 3)。硫酸铜浓度高达 200.00 mg/L 也只能使 60% 的中华湖蛭死亡, 杀灭效果不理想。

2.3 在体条件下药物对中华湖蛭的杀灭效果 在体条件下将感染中华湖蛭的鲢鱼进行不同浓度药物浸浴, 1 h 后捞至

1.3.3 在体条件下药物对中华湖蛭成虫的杀灭效果试验。 根据离体试验结果, 选择生石灰、川楝子和敌百虫对已感染中华湖蛭的鲢鱼进行在体试验。药物浓度同表 1, 养殖桶试验水体 300 L, 并在每个桶内放养 3 尾鲢鱼, 每组设 3 个重复。将鲢鱼在药物中浸浴 1 h 后捞至清水养殖桶内继续观察, 试验期间若出现鱼体体色变淡, 应迅速中断试验, 将其捞至清水养殖桶内, 试验 24 h 后再对鱼体寄生的虫体情况进行检查并记录。

1.4 数据统计与分析 试验数据均使用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 并使用 Origin 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 形态特征及鉴定 此次发现寄生在鲢、鲢鱼鳃上的虫体呈长椭圆形, 背面隆起, 腹面平坦。体长 25~60 mm, 体宽 8~22 mm, 头部呈横卵圆形, 躯干部宽而长, 略呈长卵圆形, 中部最宽阔。颈部狭且短。背面深褐色, 腹面灰白色, 前、尾两吸盘和颈部均呈米黄色, 尾吸盘部位呈深杯状, 腹部两侧有膜质的搏动囊 11 对, 能有节律地搏动, 除第 1 对较小外, 其余 10 对均较大, 主要寄生在鲢和鲢鱼鳃弓上以及鳃丝基部或鳃瓣之间(图 1)。这与《中国动物志: 环节动物门 蛭纲》^[5] 所描述的中华湖蛭(*Limnotrachelobdella sinensis*) 的形态特征相吻合。根据线粒体基因 *COI* 进行系统发育树构建, 发现寄生虫 JH20200616 与 *Limnotrachelobdella sinensis* (LC275140.1) 聚为一支(图 2), 因此根据形态学与分子生物学数据确定为中华湖蛭。

清水中暂养 24 h 进行观察。经观察发现, 浓度 25.00 和 50.00 mg/L 川楝子浸浴 1 h 的杀灭效果较差, 24 h 后观察发现虫体仍比较活跃; 浓度 100.00 和 200.00 mg/L 川楝子浸浴后, 24 h 观察发现虫体大部分脱落死亡, 但仍有少量虫体存活; 浓度 400.00 mg/L 川楝子浸浴 24 h 后虫体全部死亡脱落, 在此期间鲢鱼活动正常, 未见不良反应。

0.25 和 0.50 mg/L 敌百虫浸浴 1 h 对中华湖蛭的杀灭效果较差, 24 h 后观察发现虫体仍比较活跃; 1.00 mg/L 敌百虫

浸浴后,24 h 观察发现虫体有少量脱落,仍有少量虫体存活;2.00 mg/L 敌百虫浸浴 1 h 可以有效抑制中华湖蛭的活性,且鲢鱼活动正常,捞至清水中 24 h 后虫体全部死亡脱落;

4.00 mg/L 敌百虫浸浴 20 min 后鲢鱼出现不适反应,主要表现为体色变淡发白,迅速捞至清水中后很快恢复正常,24 h 后检查发现虫体已全部死亡脱落。

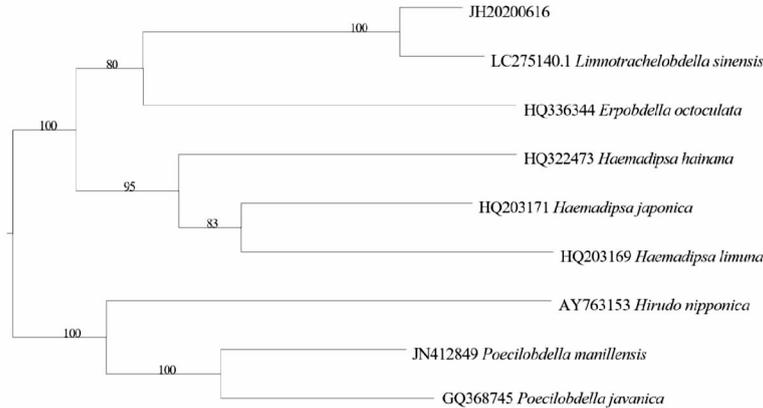
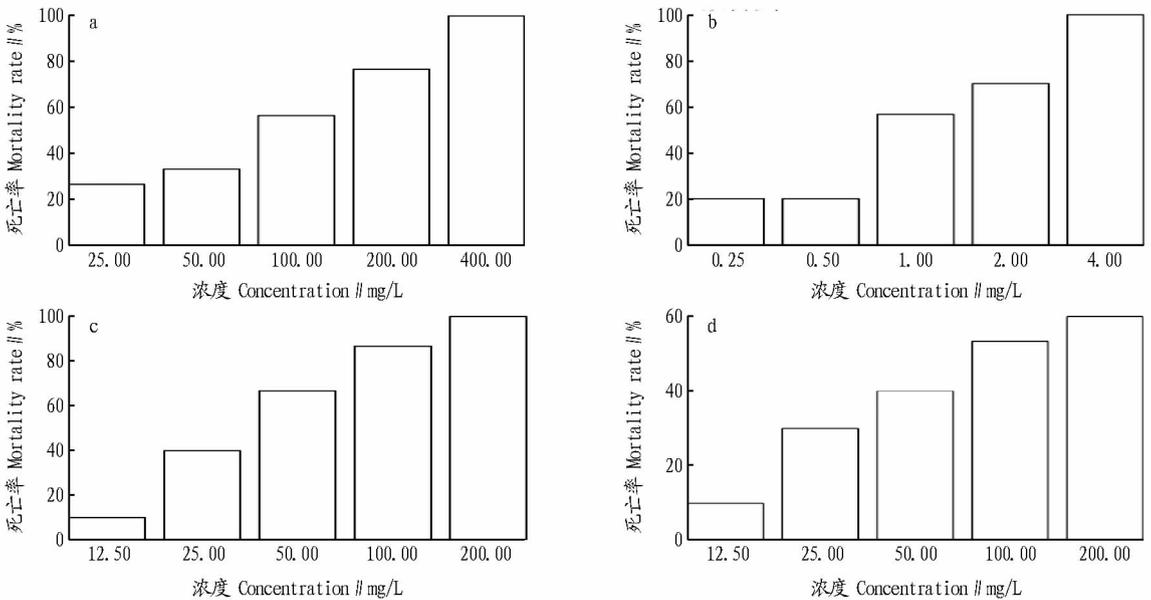


图2 中华湖蛭 JH20200616 的系统发育树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of *L. sinensis* JH20200616



注:a.川楝子;b.敌百虫;c.生石灰;d.硫酸铜。

Note:a.Toosendan;b.Trichlorfon;c.Quicklime;d.Cupric sulfate.

图3 离体条件下不同药物对中华湖蛭的杀灭效果

Fig.3 Killing effect of different drugs on *L. sinensis* in vitro

12.50、25.00、50.00 mg/L 生石灰浸浴 1 h 对中华湖蛭的杀灭效果较差,24 h 后观察发现虫体仍比较活跃;100.00 mg/L 生石灰浸浴 1 h 可以有效抑制中华湖蛭的活性,且鲢鱼活动正常,捞至清水中 24 h 后虫体全部死亡脱落;200.00 mg/L 生石灰浸浴 5 min 后鲢鱼出现不适反应,主要表现为活动剧烈,体色变淡发白,迅速捞至清水中后很快恢复正常,24 h 后检查发现虫体仅有部分死亡脱落,少数虫体仍然存活。

综上所述,对于感染中华湖蛭的鲢鳙鱼建议使用 400.00 mg/L 川楝子、2.00 mg/L 敌百虫、100.00 mg/L 生石灰浸浴 1 h 后捞至清水中暂养,可对中华湖蛭起到较好的杀灭作用,但对鲢鳙鱼安全。

3 讨论

随着淡水渔业的发展,我国大多数湖泊水库以放养鲢鳙鱼为主,2019—2022 年在浙江地区多个水质清澈的水库中出现中华湖蛭感染病例,对鲢鳙鱼养殖的危害较大。从病害流行情况来看,中华湖蛭寄生在大规格鲢、鳙鱼(平均体重 ≥ 3 kg/尾)鳃弓和鳃丝基部,感染率在 90% 以上,感染强度大小不等,一般感染强度为 8~20 条/尾。目前发现中华湖蛭主要感染鳙鱼,其他鱼类几乎不感染,仅发现在少数大眼华鳊(*Sinibrama macrops*)鳃上有少量寄生。每年 10 月底或 11 月初会在鲢、鳙鱼鳃上偶见发生,3 月份鲢鳙鱼鳃上就有肉眼可见、数量不等的幼虫;4—6 月份为感染高峰,主要观察到中华湖蛭的成虫,个体较大,感染强度高的达到 50~60 条/尾;

7月份高温以后自行脱落。调查发现水温在 27℃ 以上时鲢鳙鱼鳃丝寄生的中华湖蛭数量明显减少,仅 2~4 条/尾。中华湖蛭成虫背面深褐色,腹面灰白,与鱼鳃颜色较为相似,而且寄生在鳃瓣之间,不容易被发现。寄生处鱼鳃表皮组织受到破坏,出现发白、溃烂的现象,有的鱼鳃甚至出现空洞,引起贫血和继发感染,影响鲢鳙鱼正常生长。

大水面鱼类的寄生虫防控一直是渔业病害防控中的难点。有关鱼蛭的药物防控报道较少,唐毅等^[6]对宽体金线蛭 (*Whitmania pigra*) 幼体的急性毒性试验结果表明,宽体金线蛭幼蛭对伊维菌素、苯扎溴铵、戊二醛敏感,而对高锰酸钾、聚维酮碘、二氧化氯不敏感。洪万树等^[7]研究发现单独使用 1 mg/L 敌百虫、100~200 mg/L 福尔马林或者二者混合使用对大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 寄生鱼蛭的杀灭效果较好,而硫酸铜对其无明显杀灭作用,且高浓度硫酸铜会使宿主产生不适反应。王永波等^[8]认为 1 mg/L 的敌百虫和福尔马林对石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 鱼蛭的杀灭效果有限,0.05 mL/L 阿维菌素可以有效杀灭石斑鱼鱼蛭。敌百虫作为一种有机磷酸杀虫剂,因其高效、低毒、低残留性而被广泛用于水产养殖类寄生虫的防治,但其长期使用仍会对鱼体造成一定的毒害作用,会产生鱼体残留和水质污染等问题^[9-10]。另外,王永波等^[8]发现南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 可以摄食 1~4 cm 的鱼蛭,石斑鱼和虾苗混养可以一定程度上防止鱼蛭的暴发。

有别于池塘或小水体鱼蛭的用药,对水库鲢、鳙鱼寄生的中华湖蛭防控,从经济和可操作的角度来看,将鲢、鳙鱼进行短时间浸浴的效果最好。为了保证鱼产品的安全性,笔者建议使用 400.00 mg/L 川楝子、100.00 mg/L 生石灰浸浴 1 h 进行杀虫后清水暂养,一般虫体会死亡脱落。川楝子所含的川楝素对寄生虫肠肌产生兴奋、麻痹的作用,最终导致虫体能量不足,附着能力降低,继而被驱离于体外^[11]。王高学

(上接第 81 页)

果显示 4 种试剂盒的 Kappa 值均大于 0.90,但不同试剂盒的检测时长有差异,在检测工作中应根据具体情况合理选择试剂盒。

该试验检测结果表明,从敏感性来看,与金诺试剂盒相比,IDEXX 试剂盒更加灵敏,金诺试剂盒检测敏感性 (D_{sc}) 为 84%,检测特异性 (D_{sp}) 为 100%,特异性良好;总符合率为 91.11%, $P_o = 0.911$, $P_e = 0.496$, $Kappa = 0.824$,说明 2 种试剂盒特异性高度一致,IDEXX 试剂盒敏感性高于金诺试剂盒。

多年来,ELISA 检测方法被广泛应用于实验室的多种检测项目^[10]。能否刺激机体产生有效的免疫保护都需要进行免疫效果的评估,采取积极有效的评估方法对于检验猪场的疫苗免疫效果十分重要。实验室可从检测目的、检测成本及试剂盒操作流程简化程度等方面综合考虑,选择相应的试剂盒。该试验旨在了解 2 种 PRRSV 抗体检测试剂盒的检测效果,为从事相关检测工作的科研人员提供数据支持和理论依据,从而更好地为临床检测工作服务。

等^[12]研究 22 种植物提取液以及川楝素等化合物对金鱼指环虫的杀灭效果,发现川楝素对指环虫的杀灭作用最强。王大鹏等^[13]研究发现将刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 包裹置于浓度 60 mg/L、由苦楝树叶和其他几味中草药制成的复方药剂中浸浴 4.0~4.5 h,可彻底将虫体杀灭。生石灰的作用机理是通过提高水体 pH 来杀灭水体中的寄生虫或细菌等,最终在水中形成 $CaCO_3$,因而它是无残留、绿色环保的水产常用药物之一^[14]。虽然川楝子、生石灰等短时间浸浴对中华湖蛭具有较好的杀灭效果,但无法对库区感染中华湖蛭的鲢鳙鱼进行防控。因此,今后仍需要进一步研究中华湖蛭绿色安全的生态防控技术,实现长期和有效控制。

参考文献

- [1] 刘建康,谢平.揭开武汉东湖蓝藻水华消失之谜[J].长江流域资源与环境,1999,8(3):312-319.
- [2] 杨潼.关于湖蛭属及其一新种的记述[J].水生生物学报,1987,11(3):268-273.
- [3] 肖凌.水蛭 DNA 鉴定、活性多肽分离及其作用机制的研究[D].武汉:湖北中医药大学,2015.
- [4] 刘冉,曹志会,赵月,等.PFOA 和 PFOS 对大型蚤急性毒性试验研究[J].安全与环境工程,2015,22(4):51-55,74.
- [5] 杨潼.中国动物志:环节动物门 蛭纲[M].北京:科学出版社,1996:97-100.
- [6] 唐毅,吴荣华,袁渊,等.六种常用渔药对宽体金线蛭的急性毒性试验[J].淡水渔业,2019,49(3):78-82.
- [7] 洪万树,张其永.大弹涂鱼寄生蛭治疗实验研究[J].水产科学,2000,19(2):7-10.
- [8] 王永波,符书源,李丙顺,等.池塘养殖石斑鱼鱼蛭病防治实验[J].热带生物学报,2011,2(1):59-62.
- [9] 徐维娜,张鑫,刘文斌.敌百虫对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 毒性及其影响因素的研究[J].农业环境科学学报,2007,26(S1):68-71.
- [10] ABUBAKAR M,ALI H,ALI SHAD S, et al. Trichlorfon resistance: Its stability and impacts on biological parameters of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) [J]. Applied entomology and zoology, 2021, 56(4): 473-482.
- [11] 孙睿雷,王荻,刘红柏.中草药防治淡水鱼小瓜虫病的研究进展[J].生物技术通讯,2015,26(2):301-304.
- [12] 王高学,程超,陈安良,等.22 种植物提取物及其 6 种化合物对鱼类指环虫的杀灭研究[J].西北植物学报,2006,26(12):2567-2573.
- [13] 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[J].水产科技情报,2013,40(1):22-26.
- [14] 周彤彤,常国亮,吴楠,等.生石灰对中华绒螯蟹消化酶活性及免疫功能的影响[J].淮阴师范学院学报(自然科学版),2015,14(1):56-59.

参考文献

- [1] 马思续,崔春晓,张留君,等.不同包被抗原检测 PRRS 抗体间接 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2018,38(6):1082-1087.
- [2] 佟秀英,陈国峰.猪繁殖与呼吸综合征免疫学分析[J].中国畜牧业,2023(14):50-51.
- [3] 吴君英,韦林.规模化猪场猪繁殖与呼吸综合征的诊断与防控[J].北方畜牧业,2023(6):39-40.
- [4] 官家明,施开创,陈汉忠,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒检测技术研究进展[J].动物医学进展,2013,34(8):88-92.
- [5] 李乃果,贾松涛.不同进口蓝耳病病原抗体 ELISA 检测试剂盒比较及应用浅析[J].中国猪业,2019,14(5):82-84.
- [6] OIE. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases[M]//World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: OIE, 2013.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出入境动物检验检疫试剂盒质量评价规程: SN/T 2435—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 高登军,刘国民,陈广林,等.不同品牌试剂盒检测猪口蹄疫 O 型、A 型抗体水平对比评估[J].兽医导刊,2023(1):35-37.
- [9] 阮周曦,杨俊兴,黄韞,等.4 种检测猪繁殖与呼吸综合征抗体间接 ELISA 试剂盒的比较[J].中国口岸科学技术,2020(6):40-45.
- [10] 李燕红,王敏,夏晓.ELISA 检测过程中影响因素及应对策略[J].人人健康,2019(22):250-251.