

几种因子对草鱼饼形碘泡虫离体孢子影响的试验

陈信廉 邹为民

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380)

摘要 本文阐述了温度、酸碱度、紫外线及超声波对草鱼饼形碘泡虫 (*Myxobolus arinus*) 离体孢子的试验结果。

关键词 草鱼, 碘泡法, 孢子, 寄生虫

鱼类粘孢子虫病是一种顽固、难以对付的寄生虫性疾病。它不仅能够导致养鱼业的较大损失,而且残留在池塘底的孢子生命力特别强,甚至经十余年后还具有感染力。目前,国内外还没有什么有效药物来防治,控制该种疾病。国外 Hoffman 等人曾经报道了温度、化学物质对脑粘体虫 (*Myxobolus cerebralis*) 的影响试验。用紫外线对污染了脑粘体虫的水体进行消毒等。国内杭州大学、浙江省淡水水产研究所也提出了鲢碘泡虫 (*Myxosoma drjagini*) 对理化因子的反应结果。而本文进一步探讨了这方面的工作。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验中使用的孢子是经过分离提纯,保存在 4℃ 冰箱中备用。

1.2 鉴别孢子死活的方法 是以孢子加入氢氧化钾后,孢子放出极丝者作为活孢子的标准。步骤是先滴一滴 4% 氢氧化钾溶液在载玻片中,接着再滴一滴试验后的孢子样品在 4% 氢氧化钾溶液中,作用 5 分钟,盖上盖玻片,在显微镜下数百个以上孢子,统计放极丝孢子数和未放极丝孢子数。但是,鉴于孢子往往受外界某些因素影响,也会使个别孢子自行放出极丝。因此,做完理化因子试验后的孢子,先取样观察,统计孢子有没有放出极丝的现象,再滴加氢氧化钾,计算出实际存活数。

1.3 紫外线、温度、酸碱度及超声波对孢子的试验方法

1.3.1 孢子对紫外线的敏感试验 将装有孢子悬液的无盖容器直接放在 30 瓦的紫外线灯下 30 厘米处垂直照射。在不同的时间内取出孢子,

按上述检查鉴别孢子死活方法计算存活率。

1.3.2 孢子对温度的忍受力测定

1 热试验 将装有孢子的试管放在调温水浴箱中,根据试验所需温度升温,保温一段时间后吸出孢子检查。

2 冰冻试验 将孢子放在 -20°C 的低温冰箱中冷冻一段时间,然后检查。

1.3.3 孢子对酸碱度及氯化钾的反应 用盐酸和氢氧化钠配成不同 pH 值(pH1, pH3, pH5, pH6, pH12, pH14) 的溶液,加入孢子,作用 30 分钟后,吸出滴加氢氧化钾,计算放极丝孢子数。

配制 2% 氢氧化钾、2% 氯化钾和 2% 盐酸溶液,进行比较试验,确定促使孢子放出极丝的因子。

1.3.4 超声波对孢子的破碎试验 用 JC-2 型晶体管超声波处理机(吉林省通化市超声设备厂生产)对离体孢子作超声破碎。以三个不同的工作频率,经过不同的破碎时间,取出孢子检查。

2 实验结果

2.1 孢子对紫外线的敏感试验

孢子在紫外线灯下,分别经过 2、3、5、6、7 小时的照射,吸出按鉴别孢子的死活方法检查,检查结果如表 1。

表 1 孢子对紫外线的敏感试验

处理时间 (小时)	2	3	5	6	7	对照
未加氢氧化钾	$\frac{0}{135}$	$\frac{0}{141}$	$\frac{0}{309}$	$\frac{0}{552}$	$\frac{0}{304}$	$\frac{0}{205}$
加入氢氧化钾	$\frac{288}{403}$	$\frac{205}{400}$	$\frac{5}{306}$	$\frac{7}{316}$	$\frac{0}{320}$	$\frac{209}{406}$
存活率(%)	71.5	71.2	1.6	2	0	86

注:表中 $\frac{288}{403}$ 为 $\frac{\text{放极丝数}}{\text{检查孢子数}}$,其余同。

2.2 孢子对温度的忍受力试验

孢子在室温($15-33^{\circ}\text{C}$),平均温度 27°C 下保存、 4°C 下保存,以及经过冰冻和高温处理后,反应结果如表 2:

表 2 孢子对温度的忍受力试验

温 度 ($^{\circ}\text{C}$)		-20	4	室温 (15-33)	50	80	100	100
处 理 时 间		137天	820天	159天	2小时	2小时	0.5小时	1小时
检 查 结 果	未加氢氧化钾	$\frac{131^{\Delta}}{315}$	$\frac{0}{240}$	$\frac{0}{352}$	$\frac{1}{453}$	$\frac{0}{222}$	$\frac{151}{203}$	$\frac{0}{341}$
	加入氢氧化钾	$\frac{189}{234}$	$\frac{262}{305}$	$\frac{261}{307}$	$\frac{309}{366}$	$\frac{260}{341}$	$\frac{164}{205}$	$\frac{0}{317}$
	存活率(%)	81	85.9	85	84.4	76.2	6.4	0

* 在显微镜下,看到孢子纷纷放出极丝,结果按加入氢氧化钾后算存活率。

表 3 孢子对 pH、酸、氯化钾的反应

浓 度		pH1	pH3	pH5	pH9	pH12	pH14	2% HCl	2% KCl	2% KOH	对照
检 查 结 果	未加氢氧化钾	$\frac{0}{203}$	$\frac{0}{207}$	$\frac{0}{252}$	$\frac{0}{325}$	$\frac{2}{208}$	$\frac{0}{207}$	$\frac{0}{210}$	$\frac{0}{210}$	$\frac{162}{202}$	$\frac{0}{240}$
	加入氢氧化钾	$\frac{173}{205}$	$\frac{269}{331}$	$\frac{278}{329}$	$\frac{262}{318}$	$\frac{185}{217}$	$\frac{259}{303}$	$\frac{169}{202}$	$\frac{171}{204}$	$\frac{185}{230}$	$\frac{262}{305}$
	存活率(%)	84.4	81.3	84.5	82.4	85.3	85.5	83.7	83.8	—	85.9

表4 超声波对孢子的破碎作用

工作振幅(%)	作用时间 (分钟)				
	1	5	10	15	20
60	不破碎	不破碎	部分破碎	大部分破碎	完全破碎
70	不破碎	部分破碎	大部分破碎	完全破碎	—
80	不破碎	部分破碎	绝大部分破碎	完全破碎	—

2.3 孢子对 pH 的反应

孢子经过不同 pH 值的溶液作用后,以及 2% 的盐酸、2% 的氯化钾的作用,反应结果如表 3。

2.4 超声波对孢子的破碎作用

在不同的工作振幅,不同的作用时间,取出悬液,观察孢子的破碎程度,结果如表 4。

3 讨论

3.1 饼形碘泡虫孢子对紫外线的忍受力十分强。Hoffman 等推荐用 35000 毫瓦秒/平方厘米的剂量来作污染了脑粘体虫的水源消毒。但是,我们的实验结果与他推荐的剂量有较大的差距,这可能是种类间存在差异的缘故。能否用紫外线对污染了饼形碘泡虫的大水体进行消毒,值得探讨。

3.2 根据 Plen 和 Schäperclaus 氏的意见,孢子耐干旱和冷冻,并能长期保持其生活能力。孢子在 -20℃ 下冰冻两个月以后仍能保持其感染能力。Hoffman 及 Putz 将孢子置于 60—100℃ 条件下,发现 10 分钟已足杀死孢子。杭州大学、浙江省淡水水产研究所对白鲢鲢碘泡虫 (*Myxosoma drjagini*) 的研究试验结果表明,在 100℃,10 分钟时就有 100% 杀灭鲢碘泡虫的效果。在我们的实验中,观察到饼形碘泡

虫孢子是比较耐冰冻和高温。孢子在 -20℃ 下冷藏了 137 天后仍然保持相当高的极丝放出率。在高温时,我们的结果与 Hoffman 等人及杭州大学等的温度试验有差异。我们的实验在 100℃ 下 30 分钟后仍然有 6.4% 的极丝放出率,1 小时孢子才全部死亡。产生这个差异的原因是孢子虫种间的差异或是实验检查方法的差异,没有比较过。另外,孢子在低温状态骤然升至常温状态时会自然放出极丝,推测这可能是在低温时,孢子处于休眠状态,温度突然回升,孢子则复苏,因此放出极丝。在常温升向高温时,孢子较稳定,有较强的忍受性。

3.3 孢子对酸和弱碱反应不敏感,只有在浓度较高的碱性溶液作用下才放出极丝。对高浓度的酸性溶液忍受性较强。促使孢子极丝放出与氢氧根离子的浓度有关。

3.4 用超声波破碎孢子,并获得成功,这为开展孢子虫免疫学试验研究创造了条件。

参 考 文 献

- 1 Hoffman, G. L. and R.E. Putz, Host susceptibility and the effect of ageing, freezing, heat and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. *Progr. Fish-Cult.*, 1969, 31:35—37.
- 2 Hoffman, G.L. Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation. with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1974, 103 (3): 541—550.