

## 利用重楼杀灭罗氏沼虾寄生纤毛虫的初步研究

姚嘉赞<sup>1</sup> 沈锦玉<sup>1\*</sup> 杨国梁<sup>2</sup> 王军毅<sup>2</sup> 尹文林<sup>1</sup> 徐 洋<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

(<sup>2</sup>浙江南太湖淡水水产种业有限公司, 湖州 313001)

**摘 要** 利用系统溶剂极性法提取重楼, 制备粗提物, 以寄生罗氏沼虾上的纤毛虫(聚缩虫和靴纤虫)为指示寄生虫, 进行杀灭罗氏沼虾寄生纤毛虫的药效活性追踪试验, 初步确定重楼杀灭纤毛虫的活性部位, 并对活性部位进行安全性评价。实验结果表明, 不同极性的重楼提取物对纤毛虫均有一定的杀灭作用, 其中重楼甲醇提取物对纤毛虫的杀灭作用最强, 其浓度为 45 mg/L 时, 对纤毛虫杀灭率为 100%, 确定其含有杀灭纤毛虫的活性成分。活性部位对罗氏沼虾仔虾急性毒性实验结果显示, 甲醇提取液对仔虾的 96 h 半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 272 mg/L, 其安全浓度为 111.5 mg/L, 表明重楼是一种比较安全、杀虫效果良好的水产用中草药。

**关键词** 重楼 纤毛虫 罗氏沼虾 活性成分

**中图分类号** Q946.887 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0105-05

## Study on efficacy of *Rhizoma paridis* against the ciliates on giant freshwater shrimp *Mactobranchium rosenbergii*

YAO Jia-yun<sup>1</sup> SHEN Jin-yu<sup>1\*</sup> YANG Guo-liang<sup>2</sup>  
WANG Jun-yi<sup>2</sup> YIN Wen-lin<sup>1</sup> XU Yang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Freshwater Fisheries of Zhejiang, Huzhou 313001)

(<sup>2</sup>Zhejiang South Taihu Lake Freshwater Fish Breeding Co., Ltd., Huzhou 313001)

**ABSTRACT** To screen out the active parasitocidal components, solvent extractions from *Rhizoma paridis* were evaluated against ciliates (*Zoothamnium* sp. and *cothurnia*) with batch treatment. The bioassay-based isolation showed that methanol extract presented 100% antihelminthic efficacy at the concentration of 45 mg/L and the killing active site was proved to be its methanol extract. Meanwhile, the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values at 96 h determined from the acute toxicity tests of the killing active site for juvenile giant freshwater shrimp was 272 mg/L. The safety concentration was 111.5 mg/L. The results obtained in this study show that *Rhizoma paridis* could be a potential plant-based medicine for ciliates control.

**KEY WORDS** *Rhizoma paridin* Ciliates Giant freshwater shrimp  
Active substance

湖州市科技攻关计划项目(2008GN10)资助

\* 通讯作者。E-mail: sjinyu@126.com, Tel: (0572)2045132

收稿日期: 2009-08-30; 接受日期: 2009-10-09

作者简介: 姚嘉赞(1980-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事水产动物疾病防治研究。E-mail: yaojiayun@126.com, Tel: 13665755242

纤毛虫病是虾、蟹育苗期间的常见病,我国每年约有80%的对虾育苗场发生此病,纤毛虫多着生于蚤状幼体或糠虾幼体的鳃丝、附肢乃至整个体表,影响幼体的呼吸、摄食等生理功能,使之不能正常蜕皮变态,严重时可引起幼体大量死亡,轻者减产,重者死亡过半甚至绝产,给育苗单位带来巨大的经济损失。国外关于治疗对虾幼体聚缩虫病报道不多。目前国内主要采用甲醛(郭文等 1999)、硫酸铜(尹伦甫等 2008)、孔雀石绿(王年斌等 1999)、制霉菌素(邱绪建等 2005)等来防治该病的发生,但是硫酸铜、制霉菌素因疗效不佳或药品昂贵均未得到广泛应用,孔雀石绿具有“三致”作用,在水产养殖中已禁用(邱绪建等 2005;翟毓秀等 2007)。而甲醛对人体有害,据流行病学调查,长期接触甲醛的人,可引起口腔、鼻咽、咽喉、皮肤和消化道癌(金米聪等 2003)。同时长期使用农药及化学药物,会带来环境污染、药物残留、耐药性等问题,也成为当前食品安全和水产品出口的绿色贸易壁垒问题,因此寻找新型的杀虫药物成为当务之急。

重楼属 *Paris* 是延龄草科 *Trilliaceae* 中的一个属,现代药理研究证实,重楼有止血、祛痰和抑菌、镇静镇痛、抗早孕杀灭精子、抗细胞毒等作用(李恒 1998)。黄文通等(1995)研究表明,重楼皂苷具有较强的杀灭血吸虫尾蚴的作用;杨群芳等(2003)研究表明,重楼乙醇提取物对菜青虫具有较好的触杀和防治效果;王高学等(2009)对17种天然植物提取物杀灭鱼类指环虫研究发现,重楼对中型指环虫48 h的 $ED_{50}$ 为17.7 mg/L。通过前期研究发现,重楼 *Rhizoma paridis* 对纤毛虫(聚缩虫 *Zoothamnium* sp. 和靴纤虫 *cothurnia*)具有较强的杀灭作用,本研究通过不同极性的溶剂对重楼进行提取,制备提取物(活性成分),以寄生罗氏沼虾上的纤毛虫为指示寄生虫,并通过杀虫活性追踪实验,确定含有活性成分的提取物,对重楼杀虫功效进行评价,为进一步分离杀虫活性成分,确立重楼杀虫活性物质以及进一步开发这一植物资源提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 植物样品

重楼干燥根茎,购自湖州市中药材市场。

#### 1.1.2 供试动物

罗氏沼虾仔虾(4.3±0.3 mm),感染严重的纤毛虫(聚缩虫和靴纤虫),由浙江南太湖淡水水产种业有限公司提供。

### 1.2 仪器与试剂

R-210/215型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi),Olympus-BX51显微镜(日本),6孔细胞板。甲醛等有机溶剂均为分析纯,购自上海化学试剂有限公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 重楼粗提物的制备

称取经粉碎的重楼粉末5份各50 g,分别用6~8倍量的石油醚(沸程60~90℃)、氯仿、乙酸乙酯、甲醇和水回流提取3次,每次2 h,合并各提取液,减压浓缩至浸膏,得重楼的石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、氯仿提取物、甲醇提取物和水提取物,并用二甲基亚砷溶解定容至1 g/ml,4℃冰箱保存备用。

#### 1.3.2 杀虫活性的测定

首先对各测试样品进行预试验,在此基础上,再确定各样品的杀虫浓度。重楼粗提物设定的浓度在10.0~200.0 mg/L之间,在这个范围内,样品浓度按照浓度梯度设定。

药效试验时,按照设定浓度向充分曝气的海水中加入前述制备的各浓度,分别加入至6孔细胞培养板内,海水盐度1.4,pH 7.2,水温30±1℃。带水取严重感染纤毛虫(聚缩虫和靴纤虫)的罗氏沼虾仔虾置于载玻片上,每个载玻片放置3尾仔虾,显微镜下镜检观察,并计算仔虾体表纤毛虫的数量,用吸管立即吸至6孔细胞培养板中并放置于恒温培养箱中,其中每孔投放2~3尾仔虾,每个浓度组共投放纤毛虫50个,于4 h时取罗氏

沼虾仔虾镜检,统计纤毛虫存活数量(若虫体脱落则于6孔细胞板中观察其存活状况),计算杀虫率。并同时设立阳性对照组和二甲基亚砷对照组,其中阳性对照组甲醛的浓度梯度为0、40、80、120、160、200 mg/L,药物各浓度试验设两个平行组,重复3次。

杀虫率(%)=(初始投放纤毛虫数量-纤毛虫存活数量)/初始投放纤毛虫数量×100%

样品最高有效浓度,即最高杀虫率所对应的溶剂提取物浓度。

纤毛虫死亡的判断标准为:虫体萎缩裂解,胞质外流,纤毛不运动,肌丝断裂。

### 1.3.3 重楼杀虫活性成分对仔虾的急性毒性试验

杀虫活性部位对仔虾急性毒性试验参照王斌等(2008)、Keith等(2008)和Hii等(2007)方法。试验前,将仔虾在水族箱暂养7 d以上,自然死亡率小于0.5%,试验前1 d停食。在每个实验池中盛入充分曝气的海水50L,控温设备控制水温 $30\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,盐度1.4,pH 7.2。首先进行预试验,确定药物加入的基本剂量,即在仔虾24 h全部致死的最高浓度和96 h全部存活最低浓度之间,并按等对数间距设计7个质量浓度,即:128、160、200、250、316、400、502 mg/L,每组试验虾为20尾。试验中观察时间为1.5、3.6、12、24、48、96 h,每24 h换水,重新加药1次,并记录24、48、96 h各组仔虾的状况及存活率。

根据平均死亡率,利用直线内插法求出半致死浓度(LC<sub>50</sub>)。

安全浓度=(24h LC<sub>50</sub>×0.3)/(24h LC<sub>50</sub>/48h LC<sub>50</sub>)<sup>3</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 重楼的各溶剂粗提物杀灭纤毛虫的活性研究

分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、甲醇、水对重楼进行提取,得到各提取液浓缩物,测定并分析了各提取物杀灭纤毛虫的活性,重楼的不同极性提取物对寄生罗氏沼虾仔虾纤毛虫的杀灭作用结果见表1和图1。由表1可知,重楼的石油醚、氯仿提取物对纤毛虫的杀灭作用较差,其在所测的最高浓度200 mg/L时,二者对纤毛虫的杀灭率分别为20%和26%,且氯仿提取物组的仔虾死亡率为10%,表现出一定的毒性;重楼的乙酸乙酯提取物对纤毛虫具有一定的杀灭作用,其浓度为200 mg/L时,对纤毛虫的杀灭率为52%,该组仔虾的死亡率为5%;100 mg/L重楼的水提取物对纤毛虫的杀灭率为100%,但其对仔虾具有较强的毒性,其死亡率为40%;重楼的甲醇提取物对寄生的纤毛虫的杀灭作用最强,45 mg/L重楼甲醇提取物对纤毛虫的杀灭率为100%。阳性对照组甲醛的浓度为200 mg/L时,其纤毛虫杀灭率为100%,但其对仔虾毒性较大,4h时仔虾的死亡率为20%。同时,试验对照组存活纤毛虫数均为50个,说明助溶剂二甲基亚砷对纤毛虫的存活没有影响。

由图1可知,在实验所考察的10.0~200.0 mg/L浓度范围内,各提取物对纤毛虫的杀灭活性的顺序则依次是甲醇提取物>水提取物>乙酸乙酯提取物>氯仿提取物>石油醚提取物,由此可知,杀虫活性与提取溶剂的极性表现出一定的相关性,即随着溶剂极性的增大,杀虫活性提高。这说明重楼中的杀虫有效成分可能为极性较大的化合物。

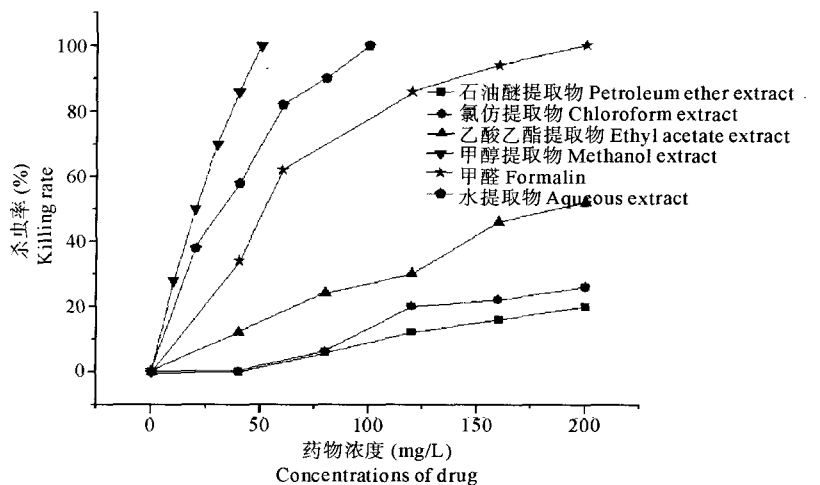


图1 4 h时重楼提取物杀灭纤毛虫活性跟踪结果  
Fig.1 Anthelmintic efficacy of extracts of *R. Paridin* against ciliates at 4 h after treatment

表1 4 h时重楼不同极性提取物对纤毛虫的杀灭作用

Table 1 Anthelmintic efficacy of extracts of Rhizoma Paridin against ciliates at 4 h after treatment

溶剂提取物 Extracts of solvents	最高有效浓度(mg/L) Highest effective concentration	最高平均杀虫率(%) Mean killing rate	仔虾死亡率 Killing rate (%)
石油醚提取物 Petroleum ether extract	200	20	0
氯仿提取物 Chloroform extract	200	26	10
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract	200	52	5
甲醇提取物 Methanol extract	45	100	0
水提取物 Aqueous extract	100	100	40
甲醛 Formalin	200	100	20

## 2.2 重楼的甲醇提取物对罗氏沼虾仔虾的急性毒性试验

重楼的甲醇提取物对罗氏沼虾仔虾的急性毒性试验结果见表2。由直线内插法计算可得,甲醇提取物对罗氏沼虾的24 h的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为429 mg/L;48 h的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为409 mg/L;96 h的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为272 mg/L;根据公式计算可得,其安全浓度为111.5 mg/L。

表2 活性部位对罗氏沼虾仔虾的急性毒性试验

Table 2 Acute toxicity of active site to juvenile giant freshwater shrimp after treatment

药物浓度 Concentrations of drugs	浓度对数 Logarithm of concentration	鱼死亡率 Killing percentage of fish(%)			
		12 h	24 h	48 h	96 h
502	2.7	45.0	100	100	100
400	2.6	15.0	30.0	45.0	100
316	2.5	10.0	10.0	30.0	60.0
250	2.4	0.0	10.0	10.0	45.0
200	2.3	0.0	0.0	0.0	25.0
160	2.2	0.0	0.0	0.0	5.0
128	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0
对照组 Control group			0.0	0.0	0.0

## 3 讨论

植物源杀虫剂具有天然、高效、毒副作用小、抗药性不显著等特点(刘玉杰等 2008),同时作为天然产物,在自然环境中易降解,可以有效降低药物对环境的破坏。因而其已成为筛选、创制无公害绿色新渔药的重要途径之一,国内外已经逐渐开始在水产领域的研究应用,Ekanem等(2007)研究表明,刺毛黧豆叶的甲醇提取物和木瓜种子的石油醚提取物具有趋杀小瓜虫的作用;Suzuki等(2006)研究表明,绿茶提取物浸浴可以安全有效的治疗大麻哈鱼的鱼波豆虫病;王高学等(2006a、b、2007)报道多种植物具有很好的杀灭鱼类指环虫的效果并从中分离出具有杀虫活性的单体化合物如血根碱、银杏酚酸、蛇床子素等。本文研究结果显示,中药重楼的甲醇提取物对纤毛虫具有很强的杀灭活性,其杀虫效率较甲醛要高,同时重楼作为植物源性杀虫药物,在抗药性、药物残留和环境问题上均优于化学药物,因此具有很好应用前景。

在研究中我们发现,4h,100%杀灭寄生纤毛虫的甲醛浓度为200 mg/L,而沈忠明等(2000)的研究结果显示30±5 mg/L的甲醛作用2h后,其对纤毛虫的杀灭率即可达到100%,其用量明显低于本研究的用量。这可能是由于药物的长期使用,致使寄生虫抗药性增强,造成效果减退,用量不断增加。

植物中的化学成分十分复杂,因此提取植物有效成分时,仅用某一种溶剂不可能将植物的组成成分都提取出来(廖世城等 2006),所以有必要采用极性由弱到强的几种不同溶剂对同一植物进行提取,使各成分依其在不同极性溶剂中的溶解度差异而分离出来,从而避免最强活性物质的“漏筛”(宋晓平等 1999)。本研究通过石油醚、氯仿、乙酸乙酯、甲醇和水5种不同极性的有机溶剂对重楼进行系统提取,并通过杀灭罗氏沼虾寄生纤毛虫的药效活性追踪实验,首次研究了重楼提取物对纤毛虫的杀灭作用,并进一步确定了甲醇提取液含有其杀虫的活性成分。由活性部位研究所确定的活性提取物一般为混合物,若要确定其有效成分,还须通过活性追踪的方法进一步研究,才能最终确定杀虫的活性成分。因此,本研究下一步将对重楼的甲醇提取物进行杀虫活性物质的追踪分离、鉴定,确定其杀虫的有效成分及结构,从而为新的杀虫渔药的开发提供进一步的理论依据和材料。

## 参 考 文 献

- 王高学,程超,陈安良,申烨华. 2006. 29种天然植物提取物对指环虫杀灭作用的研究. 西北植物学报,26(12): 2567~2573
- 王高学,王建福,原居林,申烨华,郑伟,李丽. 2007. 博落回杀灭鱼类指环虫和病原菌活性成分的研究. 西北植物学报,27(8): 1650~1655
- 王高学,赵云奎,姚嘉赞,申烨华,郑伟,王建华. 2006. 银杏酚酸杀灭鱼类病原菌和指环虫的研究. 西北农林科技大学学报,34(10): 11~15
- 王高学,赵良炜,李军. 2009. 17种天然植物提取物杀灭鱼类指环虫研究. 动物医学进展,30(6): 21~24
- 王年斌,董婧,李华,李亚晨,韩峰. 1999. 中华绒螯蟹亲蟹纤毛虫病组织病理及其防治研究. 大连水产学院学报,14(1): 30~35
- 王斌,李健,刘淇,王群. 2008. 癸甲溴铵对褐牙鲆的急性毒性及抑菌试验. 海洋水产研究,29(1): 12~19
- 尹伦甫,陈昌福. 2008. 虾蟹纤毛虫病的现状与防治方法. 科学养鱼,10(7): 7
- 刘玉杰,王宝增. 2008. 植物源杀虫剂的研究进展. 生物学教学,33(2): 8~10
- 沈忠明. 2000. 5种鱼药治疗剑尾鱼聚缩虫病的研究. 内陆水产,1: 42~43
- 宋晓平,王晶钰,李引乾. 1999. 地锦草体外抑菌有效部位的筛选试验. 西北农业大学报,27(5): 75~78
- 李恒. 1998. 重楼属植物. 北京:科学出版社,23~64
- 杨群芳,李庆,张绍梅. 2003. 几种中草药植物粗提物对菜青虫的杀虫活性初报. 四川农业大学学报,21(1): 76~77
- 邱绪建,林洪,江洁. 2005. 渔药孔雀石绿及其关联化合物检测方法研究进展. 海洋水产研究,26(2): 92~96
- 金米聪. 2003. 微量甲醛测定研究进展. 中国公共卫生,19(1): 101~102
- 郭文,房慧,孙福新,郭绍发,韦和进. 1999. 河蟹亲蟹促熟培育中纤毛虫病的诊断与防治. 齐鲁渔业,16(6): 29~32
- 黄文通,杨罗静,谈佩萍,施天益. 1995. 中草药皂甙对钉螺血吸虫毛蚴和尾蚴杀灭作用的初步观察. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志,13(6): 236
- 翟毓秀,张翠,宁劲松,耿霞. 2007. 水产品中的孔雀石绿残留及其研究概况. 海洋水产研究,28(1): 101~108
- 廖世城,曾涛,书桥现. 2006. 黄荆提取物的杀虫生物活性研究. 中国农学通报,22(6): 304~305
- Solomon, K. R., and Cooper, D. 2008. Probabilistic assessment of laboratory-derived acute toxicity data for the triazine herbicides to aquatic organisms. *Triazine Herbicides*, 425~438
- Hii, Y. S., Lee, M. Y., and Chuah, T. S. 2007. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiw). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1): 46~53
- Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Kloas, W., and Knopf, K. 2007. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol. Res.* 92: 361~366
- Suzuki, K., Misaka, N., and Sakai, D. K. 2006. Efficacy of green tea extract on removal of the ectoparasitic flagellate *Ichthyobodo necator* from chum salmon, *Oncorhynchus keta*, and masu salmon, *O. masou*. *Aquaculture*, 259: 17~27