

药物对多子小瓜虫感染的草鱼体表黏液及酶活的影响

刘芳玲^{1,2}, 厉晨阳¹, 张哲盼¹, 徐良辉¹, 卓雯文¹, 韩嘉炜¹, 张凯^{1,2}, 郑善坚^{1,2*}

(1. 浙江师范大学, 浙江金华 321004; 2. 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 321000)

摘要 为探究草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)感染多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)体表黏液的分泌及调控机制, 设计了3个预防组, 分别对健康草鱼投喂添加维生素C 500 mg/kg 饲料15 d, 水体泼洒五倍子2 mg/L、硫酸铜1 mg/L连续预防5 d后再感染多子小瓜虫5 d; 以及3个治疗组, 对健康草鱼感染多子小瓜虫5 d后再分别按上述药物进行内服或外用治疗5 d。定期测定草鱼体表黏液中的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)的酶活、黏液细胞密度和*Muc5B*基因的相对表达量。结果表明, 3个预防组的草鱼黏液中的ACP、AKP酶活普遍显著上升($P<0.05$), 五倍子和硫酸铜组的LZM酶活显著上升($P<0.05$)。除五倍子组外, 其余预防组*Muc5B*基因表达量均显著上升($P<0.05$)。维生素C治疗组的草鱼黏液ACP、AKP酶活均显著上升, 硫酸铜治疗组的草鱼体表黏液中仅AKP酶活显著上升($P<0.05$)。饲料中添加维生素C显著提高草鱼体表黏液中的酶活、黏液细胞密度和*Muc5B*基因的相对表达量, 有效促进草鱼体表黏液的分泌调控, 对抑制多子小瓜虫感染的效果显著。

关键词 草鱼; 多子小瓜虫; 体表黏液; *Muc5B* 基因

中图分类号 S943 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)10-0063-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.10.016



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Drugs on Mucus and Enzyme Activity of *Ctenopharyngodon idellus* Infected by *Ichthyophthirius multifiliis*

LIU Fang-ling^{1,2}, LI Chen-yang¹, ZHANG Zhe-pan¹ et al (1. Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; 2. Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, Jinhua, Zhejiang 321000)

Abstract In order to explore the secretion and regulation mechanism of *Ctenopharyngodon idella* infection with *Ichthyophthirius multifiliis*, three prevention groups were designed in this study. Healthy *Ctenopharyngodon idella* were fed with 500 mg/kg diet supplemented with vitamin C for 15 days, and water body was daubed with 2 mg/L Chinese gallnut and 1 mg/L copper sulfate for continuous prevention for 5 days. *Ichthyophthirius multifiliis* was used for infection for 5 days. And three treatment groups were treated with healthy *Ctenopharyngodon idella* with *Ichthyophthirius multifiliis* for 5 days, followed by oral or topical treatment for 5 days, respectively. The activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LZM), the density of mucus cells and the relative expression of *Muc5B* gene in the mucus of *Ctenopharyngodon idella* were determined regularly. The results showed that the activities of ACP and AKP in the *Ctenopharyngodon idella* mucus of the three prevention groups were significantly increased ($P<0.05$), the activity of LZM enzyme in Chinese gallnut and copper sulfate groups was significantly increased ($P<0.05$). The expression of *Muc5B* gene in all prevention groups except Chinese gallnut group was significantly increased ($P<0.05$). The activity of ACP and AKP in mucus of grass carp in vitamin C treatment group was significantly increased, while the activity of AKP in mucus of *Ctenopharyngodon idella* in copper sulfate treatment group was significantly increased ($P<0.05$). The supplementation of vitamin C significantly increased the enzyme activity, mucus cell density and the relative expression of *Muc5B* gene in the mucus surface of *Ctenopharyngodon idella*, and effectively promoted the secretion regulation of mucus surface of *Ctenopharyngodon idella*. The effect on inhibiting the infection of *Ichthyophthirius multifiliis* was remarkable.

Key words *Ctenopharyngodon idella*; *Ichthyophthirius multifiliis*; Mucus on body surface; *Muc5B* gene

鱼类的黏膜免疫系统(mucosal immune system)包括鱼类的鳃、皮肤和肠道黏膜组织是抵御外界病原侵袭的第一道防线, 鱼类鳃、皮肤黏膜组织不仅具有物理屏障作用, 还具有特异性及非特异性免疫应答^[1-2]。鱼类表皮层中杯状细胞和腺细胞具有分泌黏液的功能, 其中含有多种抗菌酶以及其他广谱性的抗菌、真菌成分, 分泌到体表的黏液具有物理性凝集沉淀外源性侵袭原及润滑作用; 鱼类皮肤组织及其分泌黏液中存在多种非特异性免疫因子, 主要包括酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)、凝集素、抗菌肽等, 具渗透调节、运动、抵御微生物入侵等功能^[3-7]。

多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)是一种纤毛类原生动物, 主要寄生在淡水鱼类的体表和鳃丝, 由于缺乏安全有效的治疗药物, 给水产养殖造成较大的经济损失^[8]。而通过调控鱼类体表黏液分泌, 激活鱼类体表的黏膜免疫, 阻止

或抵御多子小瓜虫的入侵, 可在一定程度上降低多子小瓜虫的危害^[9]。研究表明, 维生素C具有一定促进体表黏液的分泌, Dawood等^[10]在真鲷(*Pagrus major*)的饲料中添加维生素C和β-葡聚糖后, 发现真鲷皮肤黏液分泌显著增加。硫酸铜也可促进鱼体表黏液分泌增多, 鳃丝黏液分泌亢进^[11]。五倍子含有60%~80%的鞣酸, 可使鱼体皮肤黏膜腺细胞蛋白发生凝固, 引起黏液分泌抑制^[12], 硫酸铜和五倍子对多子小瓜虫掠食体有一定的杀灭作用^[13], Zhang等^[14]研究发现, 从五倍子中分离得到的五倍子葡萄糖(pentagalloylglucose)当其使用浓度为2.5~20.0 mg/L时对小瓜虫掠食体的杀灭率为100%。因此, 笔者选取上述3种药物对多子小瓜虫感染草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)前后的体表黏液分泌开展研究, 以为鱼类寄生虫病的防控研究提供理论支撑与实践指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料 健康草鱼来自浙江省金华市金农鱼种场, 规格(180±30)g。多子小瓜虫为笔者所在实验室传代培养。

主要试剂: 酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶测试盒(南

基金项目 浙江省重点研发计划项目(2019C02049, 2020C02014)。
作者简介 刘芳玲(1997—), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 研究方向: 水生动物病害。*通信作者, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 从事水生动物病害研究。
收稿日期 2021-09-02

京建成生物工程研究所); Animal Total RNA Isolation Kit (Foregene), DNA 提取试剂盒(上海生工生物技术有限公司); HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit, 2×Ultra-SYBR Mixture (High ROX) (北京康为世纪生物科技有限公司); 维生素 C (含量 90%, 华北制药股份有限公司)、五倍子 (含量 25%, 山西首爱)、五水硫酸铜 (含量 95%, 山东习化生物科技有限公司)。PCR 引物的合成委托上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 试验方法 试验在室内养殖桶内进行, 每个养殖桶内放养 20 尾健康草鱼, 暂养 2 d 后进行试验。预防试验分别外用五倍子 (2 mg/L) 5 d、硫酸铜 (1 mg/L) 5 d 和内服维生素 C (500 mg/kg) 15 d, 各设一个空白对照组及阳性对照组, 每组 3 个平行。预防用药结束后再用多子小瓜虫掠食体 (3 000 个/尾) 感染 5 d。

治疗试验, 先用多子小瓜虫掠食体 (3 000 个/尾) 感染 5 d, 再分别投喂维生素 C (500 mg/kg)、外用五倍子 (2 mg/L) 和外用硫酸铜 (1 mg/L), 连续处理 5 d, 各设一个空白及阳性对照组, 每组 3 个平行。

试验水温 25 °C, 养殖桶有独立增氧及进排水系统, 蓄水 250 L。日投喂饲料 (浙江粤海淡水鱼饲料, 粗蛋白含量 28%) 按体重 0.5% 计, 每天投喂 1 次, 每天更换新水 100%。

预防组在开始小瓜虫攻毒之后, 每天记录草鱼的存活数量并计算成活率, 持续 10 d, 空白对照组为预防对照; 治疗组在开始用药之后, 每天记录草鱼的存活数量并计算成活率, 持续 10 d, 阳性对照组为治疗对照。

1.3 酶活指标测定 分别在药物处理及多子小瓜虫感染前后, 各取 3 尾草鱼的背部体表黏液进行酶活测定。先用吸水纸擦干草鱼体表水分后, 用玻片刮取背部黏液 1 mL 于离心

管, PBS 缓冲液 10 倍稀释并匀浆, 转速 4 000 r/min 离心 5 min, 取离心后黏液上清液进行酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LZM) 的酶活测定, 在 520 nm 波长下测定 ACP、AKP 酶活测量体系的 OD 值, 在 530 nm 波长下测定 LZM 酶活测量体系的 OD 值, 并按照相应公式计算酶活。

1.4 RT-qPCR 检测 分别提取草鱼背部皮肤的 RNA, 用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 反转录合成 cDNA。根据草鱼 *Muc5B* 基因 cDNA 序列, Primer Premier 5 设计合成正反双向荧光定量引物 *Muc5B*, 且以内参基因 β -actin 作为对照。各引物序列: *Muc5B* (F: 5'-TACAATGGCGACAAGGATGA-3', R: 5'-CACTAAACCCTG-GACTGCTGA-3'); β -actin (F: 5'-CTGTATGCCTCTGGTCGT-3', R: 5'-GCTGTAGCCTCTCTCGGT-3')。每样 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析所得数据, 计算 *Muc5B* 基因的相对表达水平, 阳性对照组分别记录为感染 5 和 10 d。

1.5 草鱼背部皮肤组织切片 取草鱼背部约 1 cm×1 cm 大小的皮肤组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规梯度乙醇脱水, 透明, 包埋, 切片, AB-PAS 染色。切片标本置显微镜 (OLYMPUS BX51) 下拍照, 并按照 100 μ m 皮肤组织内黏液细胞数目进行计数。

1.6 数据处理 试验数据均采用 SPSS 21 软件进行 SNK 法多重比较检验。

2 结果与分析

2.1 草鱼存活率 在草鱼感染多子小瓜虫后, 预防组和治疗组的草鱼均有发病死亡。其中, 维生素 C 预防组和治疗组的存活率最高, 分别是 65% 和 55%, 其次为五倍子预防组和治疗组, 硫酸铜的预防组和治疗组的存活率最低, 均仅有 5%, 与对照组相比未表现出治疗或预防的效果 (图 1)。

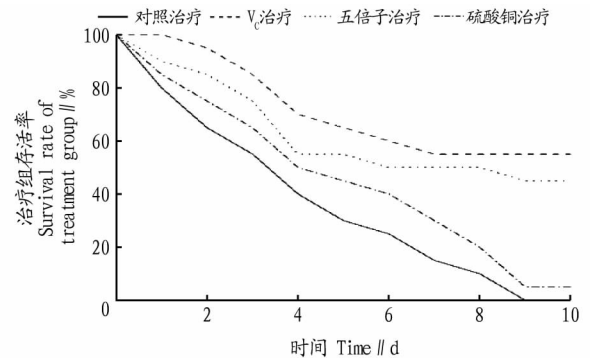
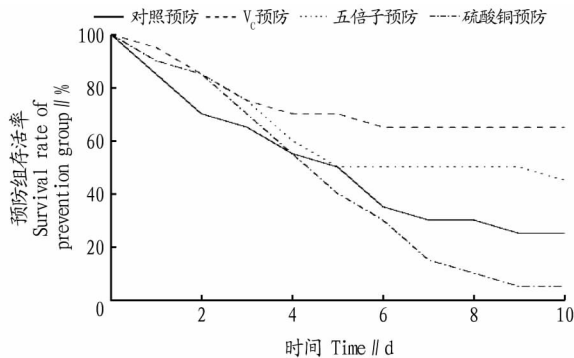


图 1 预防组和治疗组的草鱼存活率

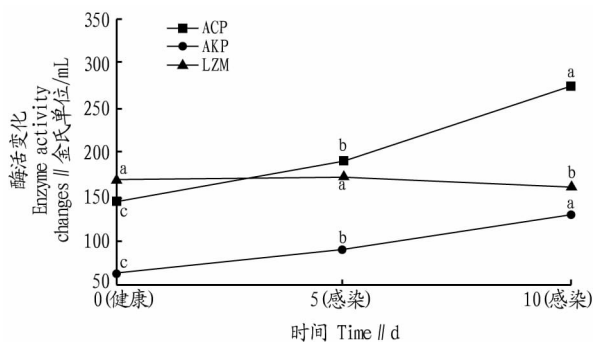
Fig.1 Survival rate of *Ctenopharyngodon idellus* in the prevention group and the treatment group

2.2 药物处理对草鱼 ACP、AKP、LZM 酶活的影响 健康草鱼感染多子小瓜虫后, 其黏液中 ACP、AKP 2 种酶活性均显著升高 ($P < 0.05$), 而 LZM 酶活性在感染 5 d 时与感染前无显著变化, 在感染 10 d 时显著下降 ($P < 0.05$) (图 2)。

在维生素 C 和五倍子预防组中, 与健康草鱼对照组相比, 草鱼黏液的 ACP 和 AKP 酶活均显著上升 ($P < 0.05$); 预防后再用多子小瓜虫感染, 预防后感染与阳性对照 5 d 相比, 维生素 C 预防组的 ACP、AKP 酶活和五倍子预防组的 ACP

酶活显著升高 ($P < 0.05$); 3 种药物在治疗试验中发现, 治疗组与阳性对照 5 d 相比, 均能使患病草鱼的 ACP 酶活和 AKP 酶活显著升高 ($P < 0.05$)。同种药物预防后与预防后感染对比可发现, 维生素 C 预防组在受到多子小瓜虫入侵之后还能使 ACP 和 AKP 酶活进一步升高, 而五倍子预防组在多子小瓜虫入侵前后并无明显变化。与健康草鱼对比, 维生素 C 预防组和治疗组的 LZM 酶活与对照组无明显差异, 而五倍子和硫酸铜预防组中的 LZM 酶活显著上升 ($P < 0.05$); 五倍子

和硫酸铜治疗组中的 LZM 酶活显著降低 ($P<0.05$) (表 1)。



注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level

图 2 草鱼对照组感染多子小瓜虫前后酶活变化

Fig.2 Enzyme activity changes before and after *Ctenopharyngodon idellus* infection in control group

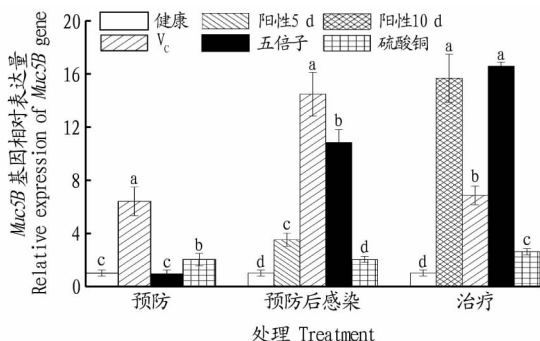
表 1 草鱼不同处理后的 ACP、AKP、LZM 酶活性变化

Table 1 Changes of ACP, AKP and LZM enzyme activities of *Ctenopharyngodon idellus* after different treatments 金氏单位/mL

处理 Treatment	ACP			AKP			LZM		
	预防	预防后感染	治疗	预防	预防后感染	治疗	预防	预防后感染	治疗
健康 Healthy	144.12± 4.19 e	144.12± 4.19 d	144.12± 4.19 d	62.88± 0.40 b	62.88± 0.40 c	62.88± 0.40 e	168.24± 2.12 b	168.24± 2.12 b	168.24± 2.12 a
阳性对照 5 d Positive control 5 d	190.01± 2.58 b	190.01± 2.58 c	190.01± 2.58 c	89.99± 2.62 b	89.99± 2.62 c	89.99± 2.62 e	171.98± 3.26 b	171.98± 3.26 b	171.98± 3.26 a
阳性对照 10 d Positive control 10 d	274.39± 2.75 a	274.39± 2.75 a	274.39± 2.75 b	129.53± 2.41 a	129.53± 2.41 a	129.53± 2.41 d	160.63± 1.83 c	160.63± 1.83 c	160.63± 1.83 b
V _c	175.59± 0.28 c	220.98± 2.80 b	320.11± 4.32 a	76.01± 0.48 c	109.89± 0.70 b	201.62± 3.19 b	163.39± 5.10 b	173.78± 3.08 b	171.34± 3.39 a
五倍子 Gallnut	164.28± 5.90 c	195.85± 3.68 c	275.75± 6.45 b	74.44± 2.86 c	65.80± 0.46 c	173.12± 4.70 c	222.71± 3.43 a	199.37± 2.89 a	160.81± 3.08 b
硫酸铜 Copper sulphate	157.13± 1.03 d	157.58± 8.97 d	275.27± 7.27 b	85.49± 4.99 b	64.99± 0.66 c	222.11± 7.58 a	218.60± 4.27 a	199.14± 1.08 a	162.83± 1.51 b

注:同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$)



注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicated significant difference ($P<0.05$)

图 3 *Muc5B* 基因相对表达量

Fig.3 Relative expression of *Muc5B* gene

3 讨论

3.1 维生素 C 对草鱼体表黏液的影响 在常规草鱼饲料中添加维生素 C (500 mg/kg) 15 d 预防后,草鱼的 *Muc5B* 基因

2.3 *Muc5B* 基因表达水平 RT-qPCR 结果表明,除五倍子外,预防组草鱼体表 *Muc5B* 基因的相对表达量相较于对照均显著升高 ($P<0.05$),维生素 C 组表达量最高;攻毒之后,维生素 C 组与五倍子组草鱼体表 *Muc5B* 基因的相对表达量显著提升,其中维生素 C 组显著高于其他组 ($P<0.05$)。4 种药物治疗组的 *Muc5B* 基因相对表达量均显著高于健康对照组 ($P<0.05$),其中五倍子组和阳性对照较高,硫酸铜组较低 (图 3),虽然阳性对照组存活率很低,但存活鱼的 *Muc5B* 基因相对表达量较高。

2.4 表皮黏液细胞观察 对草鱼体表黏液细胞的观察计数发现,健康草鱼感染多子小瓜虫后,其体表黏液细胞密度无显著差异。五倍子预防组和治疗组中草鱼体表黏液细胞密度相较于对照组无显著差异。维生素 C 预防组与治疗组的草鱼体表黏液细胞密度相较于对照组显著提升 ($P<0.05$)。而硫酸铜的预防组与治疗组的草鱼体表黏液细胞密度相较于对照组显著下降 ($P<0.05$) (表 2、图 4)。

表 2 不同处理草鱼表皮黏液细胞的密度

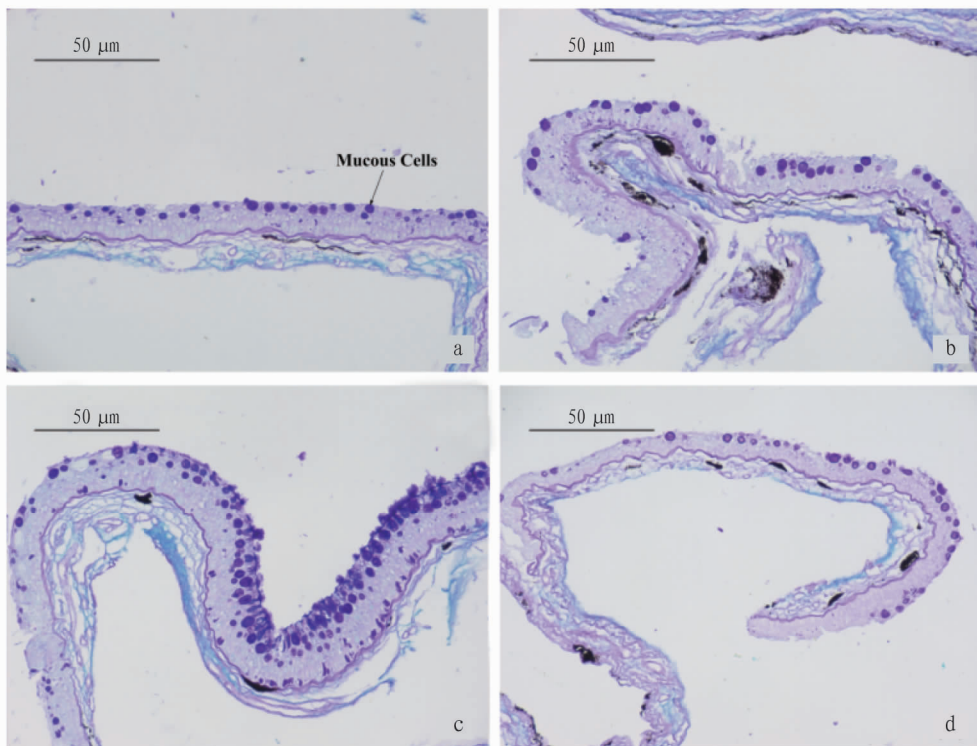
Table 2 Mucous cells density of grass carp epidermis in different treatments 个/100 μm

处理 Treatment	预防组 Prevention group	预防后感染组 Infection group after prevention	治疗组 Treatment group
对照 Control	12.3±2.3 b	13.4±1.2 b	14.2±3.1 b
维生素 C	18.2±1.8 a	17.7±0.9 a	17.6±2.4 a
五倍子 Gallnut	12.5±2.6 b	13.5±1.5 b	11.8±1.9 b
硫酸铜 Copper sulphate	9.4±1.2 c	7.7±1.7 c	8.3±2.2 c

注:同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$)

表达量较对照提高了 6 倍,再对其进行多子小瓜虫攻毒感染后,其 *Muc5B* 基因表达量是阳性 5 d 对照组的 2 倍,是感染对照组的 4 倍,表明添加维生素 C 能显著提高草鱼体表黏液的分泌量和黏液细胞密度。内服维生素 C 的健康草鱼 ACP、AKP 酶活较对照组显著上升 ($P<0.05$),LZM 酶活差异不显



注:a.健康草鱼黏液细胞;b.患病草鱼黏液细胞;c.维生素 C 预防组草鱼黏液细胞;d.硫酸铜预防组草鱼黏液细胞

Note:a.Mucous cells of healthy grass carp;b.Mucous cells of sick grass carp;c. Mucous cells of grass carp in vitamin C prevention group;d. Mucous cells of grass carp in copper sulfate prevention group

图4 草鱼表皮黏液细胞

Fig.4 Mucous cells of grass carp epidermis

著。在治疗处理中,维生素 C 组的 ACP、AKP 酶活较阳性对照组也有显著提高($P < 0.05$), *Muc5B* 基因表达量较阳性对照组低,差异显著($P < 0.05$);且预防组和治疗组的草鱼存活率也显著升高。研究发现,在饲料中添加维生素 C 能促进鱼类皮肤黏液和血清中各类过氧化物酶活性提高,如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等,可以帮助鱼体清除自由基^[15-18]。维生素 C 提高 ACP、AKP 酶活^[19-21]。可见维生素 C 不仅可以提高草鱼黏液分泌的相关基因的表达,提高鱼体体表黏液分泌量,还能提升鱼体黏液中的免疫相关酶活性,从而加强鱼体体表屏障,提高草鱼对多子小瓜虫的敏感性,在受到外界病原体入侵时能更快地上调相关免疫基因以及酶活性,提高草鱼在多子小瓜虫胁迫下的生存率。在治疗中,维生素 C 组的成活率最高,维生素 C 可能参与了预防多子小瓜虫感染的其他非特异性免疫作用,其黏液相关的 *Muc5B* 基因表达量不是很高,是否与多子小瓜虫感染少有关仍需进一步研究。

3.2 五倍子对草鱼体表黏液的影响 外用五倍子(2 mg/L)对草鱼进行预防处理后,草鱼体表黏液中的 ACP、AKP 和 LZM 酶活显著提高,表明五倍子具有提高草鱼体表黏液免疫能力的作用。多子小瓜虫攻毒后,五倍子组 *Muc5B* 基因表达量得到了显著提高,说明多子小瓜虫的感染激活了草鱼体表黏液的分泌。除 AKP 酶活无显著变化,ACP 和 LZM 酶活显著提高,在五倍子治疗处理试验中,发现五倍子组的 *Muc5B* 基因表达量较其他 2 种药物组显著提高($P < 0.05$),与阳性对照组差异不显著。ACP、AKP 酶活显著提高,LZM 酶活降低。

刁菁等^[22]研究表明五倍子中所含的大量生物碱、有机酸等免疫活性物质,能使 *Muc5B* 基因的表达量上调,促进体表黏液分泌调控,对草鱼预防多子小瓜虫感染具有积极作用。可见五倍子主要通过提高黏液分泌量抵御多子小瓜虫入侵。

3.3 硫酸铜对草鱼体表黏液的影响 研究表明硫酸铜能促进多子小瓜虫包裹的形成和脱落,能杀灭多子小瓜虫的掠食体^[23-24]。该研究中,硫酸铜能消灭部分小瓜虫,但草鱼皮肤组织中的黏液细胞密度显著下降,且皮肤组织中的 *Muc5B* 基因表达量也显著下降,可见同时对草鱼体表屏障造成了损伤,进而导致草鱼存活率显著下降。王利^[11]认为硫酸铜促进体表黏液分泌亢进,但硫酸铜是外部刺激引起鱼体的黏液分泌,具有不可持续性。而试验中连续 5 d 用药可能反而导致黏液的快速消耗,不利于对多子小瓜虫的防控。结果表明硫酸铜(1 mg/L)外用对多子小瓜虫的预防和均无明显效果。不难发现,连续的硫酸铜使用对草鱼体表黏液调控起到负面效果,导致鱼体体表屏障受损,黏液细胞密度下降,当鱼体受到多子小瓜虫入侵时,免疫相关基因及酶活均下降,反而不利于对多子小瓜虫的防控。

4 结论

综上所述,维生素 C 对多子小瓜虫的防治效果最佳,五倍子次之,硫酸铜则无明显的防治作用。其中,维生素 C 能促进黏液相关基因的表达,有效提高体表黏液酶活及体表黏液分泌水平,从而增强草鱼免疫能力,提高成活率,因此预防及治疗效果最好。五倍子在预防效果上表现一般,但在攻毒

及治疗后酶活提升,基因表达量也有所上调,因此对多子小瓜虫具有一定的治疗效果。硫酸铜可以促进多子小瓜虫从鱼体脱落形成包囊,但也会影响体表黏液细胞的形成和黏液正常分泌,并不利于草鱼免疫力的提升,因此硫酸铜对小瓜虫的预防和治疗效果均较差。上述结果表明药物可以通过调控鱼类自身的黏液分泌,增强其屏障作用的机制,从而对多子小瓜虫起到一定的防治作用,在鱼类养殖和疾病防治方面具有重要意义和良好前景。

参考文献

- [1] LAZADO C C, CAIPANG C M A. Mucosal immunity and probiotics in fish [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2014, 39(1): 78-89.
- [2] GOMEZ D, SUNYER J O, SALINAS I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2013, 35(6): 1729-1739.
- [3] GUARDIOLA F A, CUESTA A, ABELLÁN E, et al. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2014, 40(1): 24-31.
- [4] SHOEMAKER C A, LAFRENTZ B R. Growth and survival of the fish pathogenic bacterium, *Flavobacterium columnare*, in tilapia mucus and porcine gastric mucin [J]. *FEMS microbiology letters*, 2015, 362(4): 1-5.
- [5] SITJÀ-BOBADILLA A, ESTENSORO I, PÉREZ-SÁNCHEZ J, et al. Immunity to gastrointestinal microparasites of fish [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2016, 64: 187-201.
- [6] 李言伟, 江飏, 但学明, 等. 鱼类抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫研究进展 [J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 156-167.
- [7] 程卫东, 唐婉琴, 张江惠, 等. 水体中铬暴露对斑点叉尾鮰血液生理生化指标的影响 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 34(3): 33-37.
- [8] VANN C D, MEGONIGAL J P. Elevated CO₂ and water depth regulation of methane emissions: Comparison of woody and non-woody wetland plant species [J]. *Biogeochemistry*, 2003, 63(2): 117-134.
- [9] VON GERSDORFF JØRGENSEN L. The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*-Host immunology, vaccines and novel treatments [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2017, 67: 586-595.
- [10] DAWOOD M A O, KOSHIO S, EL-SABAGH M, et al. Changes in the

growth, humoral and mucosal immune responses following β -glucan and vitamin C administration in red sea bream, *Pagrus major* [J]. *Aquaculture*, 2017, 470: 214-222.

- [11] 王利. 鲤鱼实验性铜中毒的病理学研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2003: 32-34.
- [12] 姜蕾. 五倍子对鲤鱼细胞色素 P4503A 的影响和药效研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006: 10-13.
- [13] 邓永强, 汪开毓, 黄小丽. 鱼类小瓜虫病的研究进展 [J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(2): 149-153.
- [14] ZHANG Q Z, XU D H, KLESIUS P H. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Veterinary parasitology*, 2013, 198(1/2): 45-53.
- [15] ROOSTA Z, HAJIMORADLOO A, GHORBANI R, et al. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry [J]. *Fish physiology & biochemistry*, 2014, 40(5): 1601-1607.
- [16] 谢一荣, 吴锐全, 谢骏, 等. 维生素 C 对大口黑鲈生长与非特异性免疫的影响 [J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22(4): 249-254.
- [17] LYGREN B, HAMRE K, WAAGBØ R. Effects of dietary pro- and antioxidants on some protective mechanisms and health parameters in Atlantic salmon [J]. *Journal of aquatic animal health*, 1999, 11(3): 211-221.
- [18] 胡毅, 黄云, 文华, 等. 维生素 C 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响 [J]. *水产学报*, 2013, 37(4): 565-573.
- [19] 文华, 严安生, 雍文岳, 等. 饲料维生素 C 水平对草鱼的免疫功能和抵抗病菌感染的影响 [J]. *饲料工业*, 2005, 26(18): 55-59.
- [20] AI Q H, MAI K S, TAN B P, et al. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 327-336.
- [21] ROBERTS M L, DAVIES S J, PULSFORD A L. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Fish and shellfish immunology*, 1995, 5(1): 27-38.
- [22] 刁菁, 李乐, 叶海斌, 等. 一种中草药复方和 11 种单方的体外抑菌效果及对大菱鲂肠道菌群的影响 [J]. *水产科学*, 2018, 37(4): 433-440.
- [23] 高平. 高效氯氰菊酯对鲫的安全性评价及其相关研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 27-32.
- [24] 覃栋明. 硫酸铜等药物治疗鱼种小瓜虫病的试验 [J]. *科学种养*, 2016(5): 54.

(上接第 62 页)

- [11] 陈海珍, 龚春生, 陈丽秋, 等. 基于体外模拟法的城市土壤铅的健康风险评估 [J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(3): 254-257.
- [12] RODRIGUES S M, CRUZ N, CARVALHO L, et al. Evaluation of a single extraction test to estimate the human oral bioaccessibility of potentially toxic elements in soils: Towards more robust risk assessment [J]. *Science of the total environment*, 2018, 635: 188-202.
- [13] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 329-472.
- [14] 王学求, 周建, 徐善法, 等. 全国地球化学基准网建立与土壤地球化学基准值特征 [J]. *中国地质*, 2016, 43(5): 1469-1480.

- [15] JUHASZ A L, WEBER J, NAIDU R, et al. Determination of cadmium relative bioavailability in contaminated soils and its prediction using *in vitro* methodologies [J]. *Environmental science & technology*, 2010, 44(13): 5240-5247.
- [16] 许莉莉. 土壤中有效态重金属的化学试剂提取法研究进展 [J]. *冶金与材料*, 2019, 39(3): 32-33.
- [17] 刘繁灯, 袁军, 吴方圆, 等. 不同提取方法测定的油茶林地 6 种重金属有效性的比较研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(3): 525-534.
- [18] PALDEN T, MACHIELS L, ONGHENA B, et al. Selective leaching of lead from lead smelter residues using EDTA [J]. *RSC advances*, 2020, 10: 42147-42156.