肖杰尹,杨浩,顾泽茂.多子小瓜虫掠食体培养基的筛选及添加琼脂糖和EPC细胞对虫体发育的影响[J].华中农业大学学报,2026,45(1):300-307.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.01.027

多子小瓜虫掠食体培养基的筛选及添加琼脂糖和EPC细胞对虫体发育的影响

肖杰尹,杨浩,顾泽茂

华中农业大学水产学院/湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心/
农业农村部水生动物疫病专业实验室(华中农业大学),武汉 430070

摘要 为探究多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)掠食体在体外的发育条件,通过比较掠食体在不同培养基中的存活情况获得掠食体培养的最适培养基;并分析在最适培养基中添加鲤上皮瘤(EPC)细胞和琼脂糖(a:琼脂糖在虫体与细胞混合液下层;b:琼脂糖与虫体和细胞混合;c:琼脂糖在虫体和细胞混合液上层)对掠食体发育的影响。结果显示:(1)掠食体在不同培养基中的存活时间为4～6 d,其中在M199培养基中存活时间最长,但培养基中的掠食体无法发育成滋养体;(2)掠食体在添加EPC细胞团的M199培养基中可发育成滋养体,但仅可存活2 d,且滋养体的大小在第2天为(31.32±3.79) μm,无显著生长趋势(P>0.05);(3)掠食体在3种琼脂糖模式中均可发育成滋养体,且存活时间可达3 d。a、b和c 3种模式中滋养体的大小在第3天分别为(37.40±3.99)、(39.51±8.51)和(45.14±10.92) μm,模式c中的滋养体生长最快。结果表明,在M199培养基中添加EPC细胞团和琼脂糖均可促进掠食体发育成滋养体,且在琼脂糖位于虫体和细胞混合液上层的模式下滋养体生长最快。因此,在多子小瓜虫掠食体的体外培养中,建议采用添加EPC细胞团并以琼脂糖覆盖上层的M199培养基,以最优促进其向滋养体发育与生长。

关键词 多子小瓜虫;体外培养;掠食体;滋养体

中图分类号 S941.51^{+}4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)01-0300-08

多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)(以下简称小瓜虫)是一种纤毛类原生动物寄生虫,能感染多数淡水鱼类引发小瓜虫病,造成水产养殖业的经济损失[1-2]。小瓜虫的生活史有掠食体(theront)、滋养体(trophont)和包囊(tomont)3个阶段,无中间宿主[3-5]。掠食体能侵入鱼体皮肤、鳃等部位发育成滋养体;滋养体生长发育成熟后脱离宿主进入水中,最终黏附于水体基质表面形成包囊;包囊经过不断的二分裂繁殖,最终释放出具有感染性的掠食体,从而完成整个生活史循环[6-7]。

建立稳定的寄生虫培养体系是开展小瓜虫研究的基础。目前,小瓜虫的传代培养主要依赖于活体宿主感染,即从患病鱼体表收集成熟滋养体,经水中孵育获得感染性掠食体,再通过将掠食体与健康鱼共同孵育建立带虫宿主,待滋养体成熟后,重复上述步骤即可完成小瓜虫的连续培养[3]。然而,这个过程易受到宿主和水体环境的影响,导致培养过程不稳定以及传代失败[8]。寄生虫的体外培养是指在没有宿主参与的条件下,利用确定或半确定的培养基使寄生虫完成整个生活史的技术[9]。体外培养过程的条件可控,可有效避免宿主因素的不利影响。有研究表明掠食体在EMEM等培养基中的存活时间可达22 d,远超过其在水体环境中1～2 d的存活期限,初步验证了小瓜虫体外培养的可行性[10-11]。然而这些掠食体在培养基中无法发育为滋养体,提示基础培养基成分难以满足虫体发育需求。为此,Xu等[12]进一步在培养基中添加宿主来源的组织或细胞等因子,成功促进了掠食体向滋养体的转化,但虫体仍无法实现连续生长。这些研究表明,目前小瓜虫体外培养体系的构建仍受限于关键宿主因子不明、培养

收稿日期:2025-05-24
基金项目:现代农业产业技术体系专项(CARS-46);湖北省农业科技创新中心项目(2021-620-000-001-33)
肖杰尹,E-mail:xjy@webmail.hzau.edu.cn
通信作者:顾泽茂,E-mail:guzemao@mail.hzau.edu.cn

基成分组合尚需优化以及适宜环境条件不清等问题，亟需后续研究系统解析。

因此，本研究首先比较了掠食体在MEM、MEM α、DMEM 低糖、DMEM 高糖、DMEM/F12、M199、L-15、RPMI-1640、McCoy's 5A 等不同培养基中的存活情况，得到掠食体培养的最适培养基。在此基础上，通过模拟小瓜虫在宿主体内的生存环境，探究在最适培养基中添加EPC细胞和琼脂糖对掠食体发育的影响，旨在确定小瓜虫掠食体在体外发育成滋养体的关键因素。

1　材料与方法

1.1　试验用鱼及寄生虫

试验用金鱼（*Carassius auratus*）购自上海市某金鱼养殖场，体质量（4.01±0.15）g。随机抽取 10 尾金鱼，刮取体表黏液，并剪取鳃片压片镜检，确认无小瓜虫和其他寄生虫感染。试验鱼暂养 2 周，饲养在塑料水族箱中，培养用水为曝气自来水，持续用增氧泵充氧。养殖期间的水环境条件如下：水温（24.5±0.7）℃，溶解氧（7.4±0.4）mg/L，pH 8.6±0.1。每天投喂 1 次商业颗粒饲料，投喂量为鱼体质量的 2%～3%。

小瓜虫采集自湖北省武汉市华中农业大学养殖基地，宿主为黄颡鱼（*Tachysurus fulvidraco*）。小瓜虫在体传代培养参照 Hu 等[13]的方法，流程如下：将感染小瓜虫的黄颡鱼置于盛有曝气水（0.22 μm 滤膜过滤）的玻璃平皿中，先用细胞刮刀轻轻刮取病鱼体表的滋养体，再用巴氏吸管将虫体吸至另一盛有干净曝气水的玻璃平皿中漂洗 2～3 次后，将平皿置于 25 ℃孵化 14 h。使用移液枪吸取 10 μL 的掠食体虫液于载玻片上，在体式显微镜（Olympus SZX16）下计数虫体数量，共计数 10 次并计算虫液中掠食体的密度[14]。根据掠食体密度，吸取相应体积的虫液，以掠食体∶鱼＝10 000∶1 的感染强度在盛有 0.5 L 曝气水的塑料缸中（30 cm × 15 cm×20 cm）感染 6 尾健康金鱼，感染 1 h 后向缸内加入 1 L 曝气水，随后进行增氧处理。将病鱼置于 25 ℃下培养，4～5 d 后病鱼体表出现大量白点，重复上述步骤进行传代培养。

1.2　鲤上皮瘤细胞悬液及其细胞层、细胞团的制备

1）鲤上皮瘤（epithelioma papillosum cyprini cells，EPC）细胞悬液制备。EPC 由华中农业大学水产学院袁军法副教授馈赠。细胞复苏后培养于含 10% 胎牛血清（FBS）和 1% 青霉素-链霉素溶液（PS）的 M199 培养基中，待 EPC 细胞长势良好且大致铺满 T-25 细胞培养瓶时，用 2 mL EDTA-胰酶消化细胞，当 80% 的细胞收回突起变圆时，加入 2 mL 新鲜培养基终止消化，收集细胞和培养液，1 000 r/min 离心 8 min 弃上清。将收集到的细胞沉淀加入 4 mL 新鲜培养基（含 10% FBS 和 1% PS 的 M199 培养基）混匀即获得细胞悬液。

2）EPC 细胞单层制备。取上述细胞悬液 200 μL 和 1.3 mL 新鲜培养基接种于 12 孔细胞培养板中，待细胞长势良好且大致铺满培养板，即得到 EPC 细胞单层。

3）EPC 细胞团制备。取上述细胞悬液 200 μL 和 1.3 mL 新鲜培养基接种于 12 孔细胞培养板中，待细胞长势良好且大致铺满培养板时，使用细胞刮刀将 EPC 细胞沿孔板四周刮向中心，使剥离的细胞在孔板中央区域聚集并形成团块，即得到 EPC 细胞团。

1.3　无菌掠食体虫液的获得

根据 Ekless 等[10]的方法制备无菌掠食体虫液，于超净台内用移液枪将本文“材料与方法 1.1”中漂洗后的滋养体（30 个）转移至另一盛有过滤曝气水（0.22 滤膜过滤，添加 1% PS）的玻璃平皿中漂洗 5 min，重复 3 次。将漂洗过的滋养体用移液枪转移至 96 孔板中，每孔加入 250 μL 过滤曝气水和 1 个虫体。在 25 ℃孵化 14 h 后，96 孔板中有大量掠食体孵出。在超净台内，将 96 孔板中的虫液收集至 15 mL EP 管，并加入过滤曝气水稀释，得到无菌掠食体虫液（200～300 个掠食体/mL）。

1.4　掠食体最适培养基的筛选

选取 M199 培养基、DMEM 高糖培养基、DMEM/F12 培养基（均购自美国 Gibco 公司）和 McCoy's 5A 培养基（中国美伦生物公司）以及 MEM、MEM α、DMEM 低糖、L-15、RPMI-1640 培养基（均购自美国 HyClone 公司），分别与过滤的曝气水 1∶1 等体积稀释，再添加 10% FBS 和 1% PS，制备各培养基预混液。在 12 孔细胞培养板中分别加入 1.3 mL 上述培养基预混液，对照组加入 1.3 mL 过滤曝气水，并向各孔中加入 200 μL 无菌掠食体虫液，每组设置 3 个平行。将 12 孔细胞培养板置于 25 ℃培养，于体式显微镜（Olympus SZX16）下每天观察各组中掠食体的存活状态（运动能力丧失且纤毛不摆动的掠食体视为死亡[10,15]），统计各组掠食体的存活率（存活的

虫体数量/虫体总数×100%),筛选出掠食体存活率最高的培养基,即最适培养基。

1.5 添加EPC细胞的培养基中小瓜虫的存活率和生长测定

取本文"材料与方法1.2"中培养至EPC细胞单层或制备了EPC细胞团的12孔培养板,分别吸弃旧液,再加入1.3 mL M199培养基的预混液,对照组加入1.3 mL通过0.22 μm滤膜过滤的曝气水,并向各孔中加入200 μL无菌掠食体虫液,每组设置3个平行。将12孔细胞培养板置于25 ℃培养,于倒置显微镜(Olympus,CKX31)下每天观察统计各组中小瓜虫的存活率,每组随机选取5个虫体拍照测量虫体大小(长径与短径之和/2)。

1.6 培养基中琼脂糖最适添加浓度及添加模式的确定

1)培养基中最适琼脂糖质量浓度的筛选。为确定培养基中最适宜小瓜虫掠食体附着的琼脂糖质量浓度,在12孔细胞培养板中分别加入含有0、1、2、3、4、5、6 g/L的琼脂糖基本培养基1.3 mL,每个质量浓度设置3个平行,待培养基凝固后,向每个孔中加入200 μL无菌掠食体虫液,并按照本文"材料与方法1.1"中掠食体计数方法统计每孔中的虫体总数。之后将12孔细胞培养板在25 ℃培养24 h,再于体式显微镜下统计每孔中附着于琼脂糖的虫体数量[12],计算虫体的侵入率(附着于添加琼脂糖的基础培养基中的虫体数量/虫体总数)。以虫体侵入率最高组确定为琼脂糖最适添加质量浓度。

2)不同琼脂糖模式设置。在最适琼脂糖质量浓度条件下,根据琼脂糖在培养基中的不同位置,设置为a、b和c 3种琼脂糖添加模式[16]。模式a:将琼脂糖添加至虫体和细胞混合液下层,即在12孔板中,加入1.1 mL含有低熔点琼脂糖(购自西班牙Biowest公司)的基本培养基,待其凝固后,再将200 μL EPC细胞悬液和200 μL掠食体虫液混合,用移液枪将含有掠食体的混合液加入固体培养基上层;模式b:将琼脂糖与虫体和细胞混合培养,即将200 μL EPC细胞悬液、200 μL掠食体虫液与1.1 mL含有低熔点琼脂糖的基本培养基在30 ℃以下混合,随后将混合液加入到12孔细胞培养板中并待混合液凝固;模式c:将琼脂糖添加至虫体和细胞混合液上层,即在12孔培养板中先接种EPC细胞,置于25 ℃培养箱中培养24 h。然后吸弃旧液,加入1.3 mL含有低熔点琼脂糖的基本培养基,待培养基凝固后,将200 μL无菌掠食体虫液用移液枪转移至细胞和琼脂糖培养基层之间。

3)不同琼脂糖模式下小瓜虫存活率和生长效果比较。将a、b和c 3种琼脂糖添加模式组的细胞培养板置于25 ℃恒温培养箱中培养,每组设置3个平行,并于倒置显微镜(Olympus,CKX31)下每天观察统计各组中小瓜虫的存活数量,每组随机选取5个虫体,拍照测量虫体的大小。以虫体存活率最高且生长最快的组确定为琼脂糖最适添加模式。

1.7 统计与分析

试验中的数据用SPSS26.0(SPSS Inc.)、Microsoft Excel(Microsoft Corp.)和GraphPad Prism8软件分析处理。结果均以平均值±标准差(mean±SD)表示,使用IBM SPSS Statistics 26.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),差异水平为α=0.05。使用GraphPad Prism8软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 掠食体最适培养基的确定

掠食体在不同培养基中的存活率如图1所示。其中,对照组(曝气水)中掠食体存活时间为1 d,试验组中掠食体存活时间为4~6 d,均高于对照组。DMEM低糖、DMEM高糖、DMEM/F12、MEM α和McCoy's 5A培养基中掠食体在第4天的存活率分别为(10.35±0.10)%、(9.43±9.10)%、(9.01±14.83)%、(12.37±12.66)%和(18.21±13.30)%,在第5天时掠食体全部死亡。而L-15、RPMI-1640和MEM培养基中掠食体在第5天的存活率分别为(0.41±1.23)%、(0.53±1.59)%和(14.30±13.85)%,在第6天时掠食体全部死亡。M199培养基中掠食体存活时间最长,在第6天时掠食体的存活率仍有(3.77±4.79)%,在第7天时掠食体全部死亡。

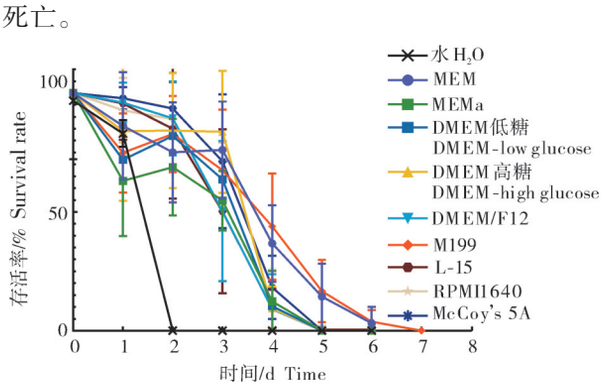


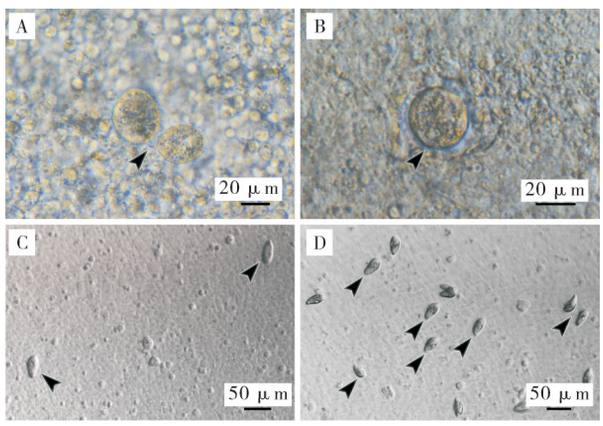
图1 不同培养基中掠食体的存活率

Fig.1 Survival rate of theront in different mediums

2.2　添加EPC细胞对小瓜虫存活率和生长的影响

在M199培养基中添加EPC细胞团，1 d后可观察到细胞团中出现卵圆形虫体，虫体在细胞团块中运动缓慢，多围绕着固定位置呈现转动状态，细胞团中的虫体与小瓜虫滋养体在形态上和运动方式上一致（图2A、B）。而在单层EPC细胞中，掠食体在培养过程中一直保持游动状态，无法附着于细胞层上，且在培养期间虫体形态一直处于哑铃型与卵圆形之间（图2C、D）。根据其自由运动的方式和形态特征，判断此时期小瓜虫始终为掠食体阶段。

如图3A所示，对照组（曝气水）中掠食体存活时间为1 d，试验组中掠食体存活时间为2～3 d，均高于对照组。添加单层EPC细胞后，掠食体在第3天的存活率为（0.63±0.88）%，在第4天时掠食体全部死亡。细胞层中的掠食体未发育成滋养体，掠食体的直径在第0、3天分别为（29.46±14.09）、（29.43±1.07）μm（图3B），无显著差异（$P>0.05$）。添加EPC细胞团后，掠食体在第2天的存活率为（34.47±32.52）%，第3天时掠食体全部死亡。EPC细胞团中的部分掠食体发育成滋养体，滋养体的直径在第0、2天分别为（30.02±0.19）、（31.32±3.79）μm（图3B），无显著差异（$P>0.05$）。可见，M199培养基中添加



A～B：附着于EPC细胞团中的滋养体（箭头指示滋养体）；C～D：EPC细胞单层中未附着的掠食体（箭头指示掠食体）；A、C：培养1 d；B、D：培养2 d。A-B：Trophont attached to the EPC cell aggregate (arrowheads indicated trophont); C-D: Theront unattached to EPC cell monolayer (arrowheads indicated theront); A, C: 1 d after culture; B, D: 2 d after culture.

图2　小瓜虫在添加EPC细胞的培养基中的形态特征

Fig.2　Morphology of *Ichthyophthirius multifiliis* in the medium added with EPC cells

单层EPC细胞不能使掠食体发育成滋养体，添加EPC细胞团可促进掠食体发育成滋养体，但滋养体没有生长的趋势。

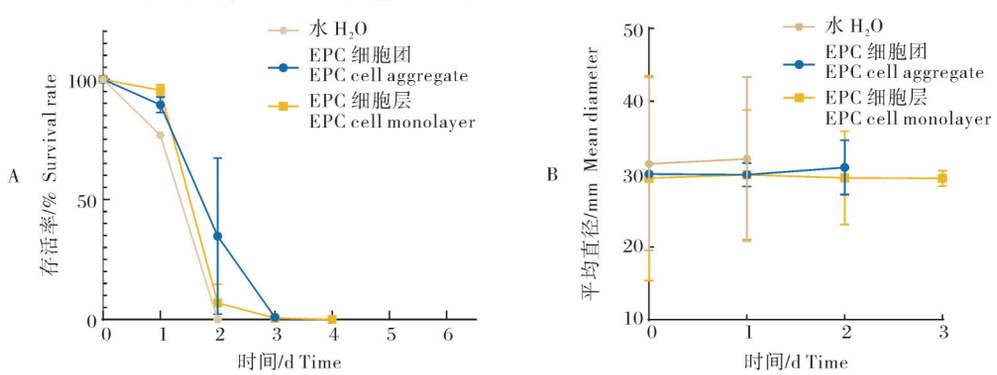


图3　添加EPC细胞的培养基中小瓜虫的存活率（A）和平均直径（B）

Fig.3　Survival rate (A) and mean diameter (B) of *Ichthyophthirius multifiliis* in the medium added with EPC cells

2.3　不同琼脂糖浓度和添加模式下小瓜虫的存活率和生长特征

1）培养基中最适琼脂糖浓度的确定。如图4所示，随着琼脂糖质量浓度的上升，掠食体的侵入率呈先上升后下降的趋势。琼脂糖质量浓度为1 g/L时，培养基呈液态，掠食体侵入率为0。当琼脂糖质量浓度为3 g/L时，培养基呈固态，此时侵入率最高，达到（28.73±10.53）%。而当琼脂糖质量浓度为6 g/L时，培养基硬度大，导致虫体无法钻入，此时侵入率为0。可见，在M199培养基中添加质量浓度为3 g/L的琼脂糖最适合掠食体附着。

2）3种琼脂糖模式下小瓜虫的存活率和生长特征。3种琼脂糖添加模式下小瓜虫掠食体均可附着于含琼脂糖的培养基中，侵入含琼脂糖的培养基后瓜虫的形态如图5所示。培养基中的虫体均呈卵圆形，且多围绕着固定位置呈现转动状态，与小瓜虫滋养体在形态上和运动方式上一致（图5A～C）。

如图6所示，对照组（曝气水）中掠食体存活时间为1 d，而模式a、b、c中掠食体存活时间为3 d，均高于

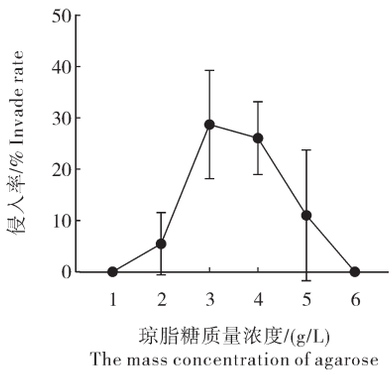
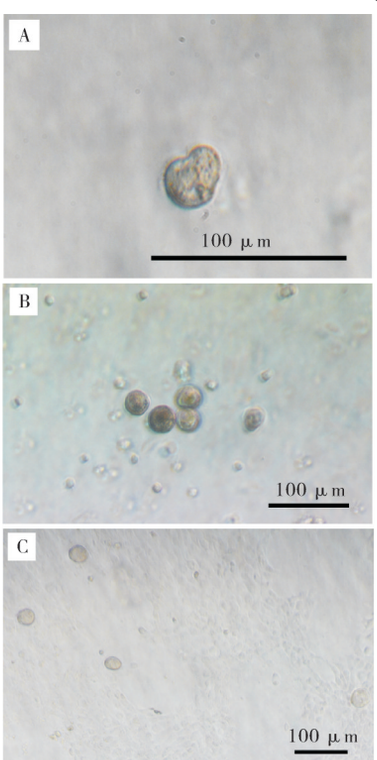


图4 小瓜虫在添加不同质量浓度琼脂糖的培养基中的侵入率

Fig.4 Invasion rate of *Ichthyophthirius multifiliis* in media with different concentrations of agarose

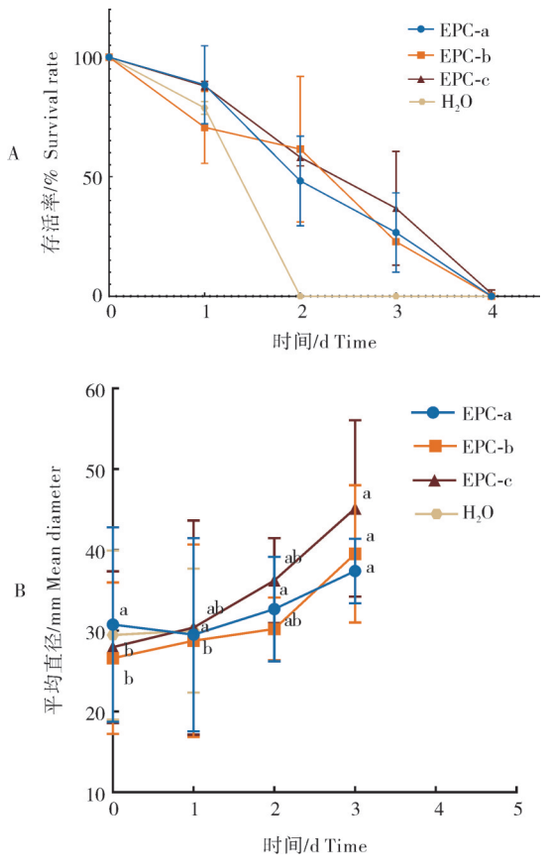


A:模式a中的滋养体;B:模式b中的滋养体;C:模式c中的滋养体。A: Trophont in model a; B: Trophont in model b; C: Trophont in model c.

图5 小瓜虫滋养体在3种琼脂糖模式中的形态特征

Fig.5 Morphology of trophont in three agarose models

对照组(图6A)。模式a、b、c中掠食体在第3天的存活率分别为(26.73±16.59)%、(22.86±1.22)%、(36.79±23.74)%,在第4天时掠食体全部死亡。3种琼脂糖模式中均有部分掠食体发育成滋养体,滋养体的直径均有变大的趋势(图6B)。第1天时,模式a、b、c中滋养体直径分别为(29.51±11.96)、(28.79±11.95)、(30.41±13.26) μm;第3天时,模式



图中同组不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Different letters in the same group represent significant differences ($P<0.05$).

图6 3种琼脂糖模式中小瓜虫的存活率(A)和平均直径(B)

Fig.6 Survival rate (A) and mean diameter (B) of *Ichthyophthirius multifiliis* in three agarose models

a、b、c中滋养体直径分别显著增长为(37.40±3.99)、(39.51±8.51)、(45.14±10.92) μm。综上,模式c中滋养体直径由(30.41±13.26) μm显著生长为(45.14±10.92) μm,滋养体生长速度最快,因此模式c(将掠食体培养于添加3 g/L琼脂糖的M199培养基和EPC细胞的细胞单层之间)促进掠食体发育为滋养体的效果最佳。

3 讨 论

本研究比较了多子小瓜虫掠食体在不同培养基中的存活情况,在筛选出掠食体最适培养基的基础上,探究了添加鲤上皮瘤(EPC)细胞和琼脂糖对掠食体发育的影响。结果发现M199培养基可维持掠食体存活时间最长,证实其最适于掠食体培养。在添加EPC细胞团的M199培养基中,掠食体可发育成滋养体,但滋养体无明显生长。此外,在培养基中按照不同模式添加琼脂糖,掠食体均可发育成滋

养体且存活时间可达3 d，其中以琼脂糖位于虫体和细胞上层的模式对滋养体生长的促进作用最为显著。

本研究发现，掠食体在各种培养基中可存活4～6 d，显著高于其在水环境中的生存时间，表明这些培养基在一定程度上为掠食体的生存提供了所需的营养物质。其中，在MEM培养基中掠食体可存活5 d，而在M199培养基中掠食体存活时间最久，可达6 d。相比于仅含有基础必需成分（无机盐、糖、必需氨基酸和维生素组成）的MEM培养基，M199培养基还含有腺嘌呤、腺苷、次黄嘌呤、胸腺嘧啶等特有成分[17]，推测这些成分在维持小瓜虫掠食体的存活中具有重要作用。血清同样是影响小瓜虫掠食体存活的重要因素。Ekless等[10]在EMEM培养基中添加10%的胎牛血清，可使掠食体存活4 d。彭碧琳[11]的研究显示，在含胎牛血清的EMEM培养基中掠食体可存活14 d，而在含鳗鱼血清的条件下可存活22 d。本研究在培养基中添加10%的胎牛血清后，掠食体存活时间与Ekless等[10]的结果基本一致，至于在M199培养基中添加鳗鱼血清能否进一步延长掠食体存活时间有待后续验证。尽管添加血清能够延长掠食体在培养基中的存活时间，但所有条件下掠食体均无法发育成滋养体。因此，仍需结合小瓜虫的寄生生物学特性，探究促进小瓜虫掠食体发育的关键条件。

小瓜虫主要寄生在鱼皮肤等部位的组织中，寄生过程中虫体被多层宿主上皮细胞包被[18-19]。前期研究也表明，鱼皮肤的上皮细胞是小瓜虫在寄生期间摄取的主要营养物质之一[20-21]。在本研究中，我们在M199培养基中加入单层EPC细胞后，发现掠食体无法发育为滋养体。Xu等[12]将宿主鱼不同部位的组织或细胞添加至M199培养基时，发现掠食体虽然无法附着于细胞单层中，但能附着于鱼组织中发育成滋养体。Margaret[22]的结果也显示，在接种了大西洋鲑细胞的EMEM培养基中，掠食体不能附着于细胞单层中，但能附着于细胞层较厚的区域。这些结果表明单层细胞可能无法为小瓜虫掠食体提供附着所需的条件。因此，本研究将EPC细胞通过细胞团的形式加入到培养基中，结果发现掠食体不仅可以附着于细胞团中，而且可以发育成为滋养体，这暗示了小瓜虫掠食体需要附着于封闭的细胞环境，从而完成自身的发育。然而，本研究中EPC细胞团的制作难度大，且细胞刮刀的处理会造成细胞损伤，导致细胞团在培养过程中易出现肿胀变形和脱落现象，不利于小瓜虫的生长。因此，如何构建更稳定、更适合小瓜虫在EPC细胞中发育的培养条件，仍需进一步深入探究。

琼脂糖能利用其凝胶化特性形成形状可塑的三维网络结构，这种结构能在细胞培养的过程中为细胞提供支撑，同时防止细胞附着生长[23]。近年来，琼脂糖被广泛应用于寄生虫的体外培养领域[24-25]。刺激隐核虫（*Cryptocaryon irritans*）是引起海水鱼小瓜虫病的病原性纤毛虫，它的寄生特性与小瓜虫相似。Yoshinaga等[16]曾通过在L-15培养基中加入琼脂糖，用琼脂糖凝胶层和细胞层将刺激隐核虫包裹，以模拟虫体寄生在鱼类皮肤中的环境，结果发现刺激隐核虫可在单层细胞和琼脂糖凝胶层间完成生长发育。据此，本研究尝试用3种不同方式（a：琼脂糖在虫体与宿主细胞下层，b：琼脂糖鱼虫体和宿主细胞混合培养，c：琼脂糖在虫体和宿主细胞上层）向培养基中添加琼脂糖来模拟小瓜虫掠食体在宿主体内被宿主细胞包围的生存环境。结果发现3种琼脂糖模式均可促进掠食体发育成滋养体，且滋养体在添加琼脂糖的环境中均有生长趋势，这也验证了“掠食体在体外发育需要封闭环境”的观点。然而，模式a和b中的虫体生长速度比模式c慢，这可能是因为在模式a和b中琼脂糖组成的三维网络结构将小瓜虫与EPC细胞分离，导致虫体难以及时摄取细胞作为营养物质。此外，在本研究中，滋养体最多只能生长到40～50 μm，远小于其在宿主体内发育成熟后的大小（500～1 000 μm）[20,26]。这些结果说明本研究使用的培养体系仍无法完全满足滋养体发育的营养需求，在后续研究中，可以进一步添加宿主皮肤、黏液的匀浆等物质以探究其对滋养体发育的影响。

参考文献 References

[1] MATTHEWS R A. *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts[J]. Advances in parasitology, 2005, 59: 159-241.

[2] 王哲，刘春雷，顾泽茂，等. 多子小瓜虫的形态发生及其寄生导致翘嘴鲌鳃组织病理变化[J]. 水生生物学报，2016，40(5)：935-941. WANG Z, LIU C L, GU Z M, et al. Morphology and morphogenesis of *Ichthyophthirius multifiliis* and pathological study of gills of *Culter alburnus*[J]. Acta hydrobiologica sinica, 2016, 40(5): 935-941 (in Chinese with English abstract).

[3] LI M, BASTOS GOMES G, ZHAO W S, et al. Cultivation of

fish ciliate parasites: progress and prospects [J]. Reviews in aquaculture, 2023, 15(1): 142-162.

[4] EWING M S, KOCAN K M. Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish [J]. Parasitology today, 1992, 8(6): 204-208.

[5] YANG H, WANG Z, XIAO J Y, et al. Integrated morphological and transcriptome profiles reveal a highly-developed extrusome system associated to virulence in the notorious fish parasite, *Ichthyophthirius multifiliis* [J/OL]. Virulence, 2023, 14: 2242622 [2025-05-24]. https://doi. org/10.1080/21505594. 2023. 2242622.

[6] SONG K G, LING F, HUANG A G, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of antiprotozoal compounds isolated from *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in fish [J]. International journal for parasitology: drugs and drug resistance, 2015, 5(2): 58-64.

[7] LIU Y M, ZHANG Q Z, XU D H, et al. Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma* longa against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp [J]. Veterinary parasitology, 2017, 236: 128-136.

[8] DICKERSON H W, LOHR A L, GRATZEK J B. Experimental intraperitoneal infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), with *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) [J]. Journal of fish diseases, 1985, 8(1): 139-142.

[9] HUTSON K S, CABLE J, GRUTTER A S, et al. Aquatic parasite cultures and their applications [J]. Trends in parasitology, 2018, 34(12): 1082-1096.

[10] EKLESS L, MATTHEWS R. *Ichthyophthirius multifiliis*: axenic isolation and short-term maintenance in selected monophasic media [J]. Journal of fish diseases, 2006, 16 (5): 437-447.

[11] 彭碧琳. 小瓜虫体外培养研究及青蒿琥酯等药物对小瓜虫的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2007. PENG B L. The study of cultivating *Ichthyophthirius multifiliis in vitro* and the effect of artesunate on *Ichthyophthirius multifiliis* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007 (in Chinese with English abstract).

[12] XU D H, KLESIUS P H, SHOEMAKER C A. Evaluation of a cohabitation challenge model in immunization trials for channel catfish *Ictalurus punctatus* against *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Diseases of aquatic organisms, 2007, 74(1): 49-55.

[13] HU J B, YANG H, TU X, et al. Epicatechin gallate: a promising agent isolated from *Sargentodoxa cuneata* for the treatment of ichthyophthiriasis in goldfish (*Carassius auratus*) [J/OL]. Aquaculture, 2023, 574: 739724 [2025-05-24]. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739724.

[14] FU Y W, ZHANG Q Z, XU D H, et al. Cynatratoside-C efficacy against theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*, and toxicity tests on grass carp and mammal blood cells [J]. Diseases of aquatic organisms, 2015, 117(1): 13-20.

[15] TANGE E Ø, MATHIESSEN H, VON GERSDORFF JØRGENSEN L. Effects of pH on free-living stages of a Nordic strain of the economically important freshwater fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. International journal for parasitology, 2020, 50(10-11): 859-864.

[16] YOSHINAGA T, AKIYAMA K, NISHIDA S, et al. *In vitro* culture technique for *Cryptocaryon irritans*, a parasitic ciliate of marine teleosts [J]. Diseases of aquatic organisms, 2007, 78 (2): 155-160.

[17] YAO T, ASAYAMA Y. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues [J]. Reproductive medicine and biology, 2017, 16(2): 99-117.

[18] VENTURA M T, PAPERNA I. Histopathology of *Ichthyophthirim multifiliis* infections in fishes [J]. Journal of fish biology, 2006, 27(2): 185-203.

[19] YANG H, TU X, XIAO J Y, et al. Investigations on white spot disease reveal high genetic diversity of the fish parasite, *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) in China [J/OL]. Aquaculture, 2023, 562: 738804 [2025-05-24]. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738804.

[20] 倪达書, 李连祥. 多子小瓜虫的形态、生活史及其防治方法和一新种的描述 [J]. 水生生物学集刊, 1960(2): 197-225. NI D S, LI L X. Studies on the morphology and life cycle of *Ichthyophthirius multifiliis* and its control, with a description of a new species [J]. Acta hydrobiologica sinica, 1960(2): 197-225 (in Chinese with English abstract).

[21] 卢全章, 郭琼林. 寄生虫感染草鱼胸腺的观察 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(1): 95-96. LU Q Z, GUO Q L. Observation on the infection of the thymus of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by parasites [J]. Acta hydrobiologica sinica, 1990, 14 (1): 95-96 (in Chinese).

[22] MARGARET H L. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet: development and assessment of *in vitro* systems for long term maintenance [D]. Plymouth, South West England, UK: University of Plymouth, 1999.

[23] 罗思施, 汤顺清. 琼脂糖在组织工程中的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(6): 68-74. LUO S S, TANG S Q. Research progress of agarose in tissue engineering [J]. China biotechnology, 2015, 35(6): 68-74 (in Chinese with English abstract).

[24] MUNIZ R S, CAMPBELL P C, SLADEWSKI T E, et al. Revealing spatio-temporal dynamics with long-term trypanosomatid live-cell imaging [J/OL]. PLoS pathogens, 2022, 18(1): e1010218 [2025-05-24]. https://doi. org/10.1371/journal.ppat.1010218.

[25] SHAW S, KNÜSEL S, ABBÜHL D, et al. Cyclic AMP signalling and glucose metabolism mediate pH taxis by African trypanosomes [J/OL]. Nature communications, 2022, 13(1): 603 [2025-05-24]. https://doi. org/10.1038/s41467-022-28293-w.

[26] EWING M S, LYNN M E, EWING S A. Critical periods in development of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) populations1 [J]. The journal of protozoology, 1986, 33 (3): 388-391.

Screening of medium for *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and effect of adding agarose and EPC cells to medium on their development

XIAO Jieyin, YANG Hao, GU Zemao

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention/National Aquatic Animal Diseases Para-Reference Laboratory (HZAU), Wuhan 430070, China

Abstract *Ichthyophthirius multifiliis* is a ciliated protozoan parasite that infects various freshwater fish, causing ichthyophthiriasis. The life cycle of *I. multifiliis* comprises three stages: theront, trophont, and tomont. Theront, the only infective stage, invades the host and transforms into the trophont. This study first compared the survival of theronts in different cell culture media to identify the most suitable medium for *in vitro* culture. Based on these findings, the effects of adding epithelioma papillosum cyprini (EPC) cells and agarose to the culture medium on theront development were investigated using three models: (a), agarose was positioned in the lower layer beneath the theront and cell mixture; (b), the agarose mixed directly with theront and cell; and (c), agarose positioned in the upper layer above the theront and cell mixture. The survival rate and size of *I. multifiliis* were calculated for each condition. The results were as follows: (1) The longest survival time for theronts in medium M199 was up to 6 d. However, theronts were unable to transform into trophonts. (2) The addition of EPC cell aggregates to medium M199 enabled theronts to transformed into trophonts, which survived for 2 d. The size of trophonts was (31.32±3.79) μm on d 2, with no significant growth trend observed. (3) In all three agarose models, theronts was transformed into trophonts and survived for 3 d. The diameters of trophonts in models a, b, and c modes were (37.40±3.99) μm, (39.51±8.51) μm, and (45.14±10.92) μm, respectively, on day 3. In conclusion, the present study demonstrated that adding either EPC cell aggregates or agarose to medium M199 promoted the transformation of theronts into trophonts. However, significant trophonts growth occurred only in the model where the medium was supplemented with both agarose and cells.

Keywords *Ichthyophthirius multifiliis*; *in vitro* culture; theront; trophont

(责任编辑:边书京)