

节丛孢属真菌抗反刍动物消化菌株的体外筛选*

秦泽荣¹ 缪作清² 周 虎¹ 张向利¹ 刘杏忠² 陈 刚¹ 王金洛³

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)¹ (中国农业科学院生物防治研究所 北京 100085)²

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所 北京 100085)³

摘要: 利用食线虫真菌对动物寄生线虫病进行生物防治是寄生虫学当今的研究热点之一。获得能够通过动物消化道的食线虫菌株是取得成功的前提。本文采用模拟反刍动物瘤胃和真胃的消化道作用,对84株节丛孢属的食线虫真菌进行了体外抗消化筛选。结果表明:共有23株通过了24h瘤胃液的处理,通过率为27.38%;16株同时还通过了4h盐酸-胃蛋白酶的处理,通过率为19.04%。

关键词: 节丛孢属,食线虫真菌,生物防治,体外筛选

中图分类号: S855.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-022-03

IN VITRO STRESS SELECTION OF DIGESTIVE-RESISTANT STRAIN OF *ARTHROBOTRYS* FOR THE BIOCONTROL OF PARASITIC NEMATODES

QIN Ze-Rong¹ MIAO Zuo-Qing² ZHOU Hu¹ ZHANG Xiang-Li¹

LIU Xing-Zhong² CHEN Gang¹ WANG Jin-Luo³

(¹ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

(² Biological Control Institute, China Agricultural Academy, Beijing 100085)

(³ Beijing Academy of Agriculture & Forestry, Beijing 100085)

Abstract: Experimental procedures were designed to select nematophagous fungi (*Arthrobotrys* spp.) that were able to survive *in vitro* conditions simulating the digestion in rumen and abomasum of cattle. 23(27.38%) isolates survived the 24 hours of rumen fluid, and 16(19.04%) isolates passed rumen fluid and the pepsin HCl solution.

Key words: Nematophagous fungi, *Arthrobotrys*, *in vitro* selection

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39700108)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39700108)

收稿日期: 1998-11-25, 修回日期: 1999-04-12

动物线虫病每年给畜牧业经济造成了巨大损失。迄今动物线虫病的防治仍主要依靠化学药物治疗,但是,化学药物治疗易引起抗药性、药物残留和环境污染等问题。因此,对线虫病防治必须尽可能地探求新的解决途径。

利用天敌进行生物防治具有无污染、无残留、不产生抗药性和持续时间较长等优点,为化学防治所不及^[1]。在线虫的天敌中,以捕食线虫真菌和线虫内寄生真菌最为引人注目^[1~7]。早在 1888 年就有人从马粪堆中分离到了食线虫真菌,迄今已发现 150 多种真菌具有捕食线虫的能力^[6]。国外在农作物线虫的生物防治上已有了商品化的抗线虫真菌剂^[7]。在兽医领域中,近几年来,食线虫真菌作为一种可能的防治手段已引起广泛的注意,其中节丛孢属的菌种尤为引人注目。

本研究拟通过模拟反刍动物瘤胃和真胃的消化作用的方法来快速筛选可能抗反刍动物体内消化的节丛孢属真菌株,为进一步开展反刍动物线虫病的生物防治研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌

见表 1,分别由中国农业大学动物医学院和中国农业科学院生物防治研究所采集、保存(另见报道)^[8]。

1.2 培养基和菌株的准备

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),按标准

方法配制,高压蒸汽灭菌备用。试验时将菌株接种在 PDA 培养基上,25℃ 恒温箱中培养 5~10d,观察菌株的菌态,记录菌丝体、分生孢子、厚垣孢子等情况。

1.3 瘤胃液

采自中国农业大学试验牧场的青年黄牛,于清晨用胃管抽取,2500r/min 离心 3min,除去草料等杂物,再经无菌抽滤后,冰箱保存备用。使用时,将其预置在温箱中,使其温度升至 37℃。

1.4 盐酸-胃蛋白酶

胃蛋白酶按 1% 的浓度配制,然后用 10% 的稀盐酸调节 pH 值到 2.5,现配现用。

1.5 抗瘤胃液试验

将升温至 37℃ 的瘤胃液无菌分装到无菌小试管中,每管 3mL,将预备好的各菌株的菌丝体分别加入到上述试管中,于 37℃ 培养箱中作用 24h。

1.6 抗盐酸-胃蛋白酶试验

将经瘤胃液作用过 24h 的菌株样离心,加入 2mL 1% 的盐酸-胃蛋白酶液,在 37℃ 下作用 4h。

1.7 成活菌株的确认

菌株在经瘤胃液和盐酸胃蛋白酶作用后,将其分别接种于 PDA 培养基中,25℃ 条件下培养 5~6d,在超净工作台上用解剖镜观察是否有目标菌的生长和生长情况。必要时,可用次氯酸钠消毒后的牙签挑取少量菌体,经乳酚油

表1 抗消化食线虫真菌的体外筛选结果

菌种名	数量	通过瘤胃液处理		通过瘤胃液和盐酸胃蛋白酶处理	
		菌株数	通过率	菌株数	通过率
<i>Athrobotrys oligospora</i>	20	5	25%	5	25%
<i>A. robusta</i>	15	5	33%	2	13%
<i>A. conoides</i>	9	2	22%	2	22%
<i>A. arthobotryoide</i>	6	1	17%	1	17%
<i>A. vermicola</i>	11	4	36%	3	27%
<i>A. oviformis</i>	12	3	25%	1	8%
<i>A. musiformis</i>	4	1	25%	0	0%
<i>A. javanica</i>	3	1	33%	1	33%
<i>A. oligospora</i> var <i>microspora</i>	4	1	25%	1	25%
合 计	84		23(27.38%)		16(19.04%)

染色,确认是否为目标菌株。

2 结果

由表1可见,84个菌株共有23个菌株通过了瘤胃液的作用,通过率为27.38%,其中 *Athrobotrys oligospora*、*A. robusta*、*A. conoides*、*A. arthrobotryoides*、*A. vermicola*、*A. oviformis*、*A. musiformis*、*A. javanica*、*A. oligospora* var *microspora* 的通过率分别25%、33%、22%、17%、36%、25%、25%、33%和25%。同时通过瘤胃液和盐酸-胃蛋白酶液的共有16个菌株,通过率为19.04%,上述菌株的通过率分别为25%、13%、22%、17%、27%、8%、0%、33%、25%。

3 讨论与小结

有人曾在牧场撒放噬线虫真菌孢子试图减低感染性线虫幼虫的密度,从而减少家畜的感染。但由于环境中真菌间的相互拮抗作用较强,效果不理想^[1]。在以粪便作为底物的环境中,显然真菌间的拮抗作用要小得多。而且绝大多数线虫卵均通过粪便而排出体外。因此,如果将食线虫真菌添加在饲料中,让真菌能够随粪便一起排出体外,当粪便中的寄生虫卵发育成幼虫时,真菌将其杀灭,达到净化环境,减少动物线虫感染的目的。此外,通过食线虫菌株加入饲料中来防治线虫感染,与传统的用药方式极为相似,易于推广应用。可见,上述技术路线有较多的优势。丹麦学者 Larsen 等人通过上述方法已成功地将一株耐消化食线虫真菌(*Duddingtonia flagrans*)添加在饲料中显著地降低多种家畜的线虫感染量(高达70%~90%)^[5,6]。但大多数菌株不能耐受消化

作用。可见,筛选到抗动物消化道的菌株是获得成功的关键之一。

动物的消化作用比较复杂,包括从口腔进入开始到肛门排出为止的整个过程。Larsen 等人曾对反刍动物消化食线虫真菌的各个可能环境进行过体外模拟研究,他们的结果表明:尽管消化系统的多个环节对食线虫真菌均有一定的消化作用,但关键环节在于瘤胃液和真胃中胃蛋白酶及盐酸的作用^[3]。因此,本研究选用瘤胃液和盐酸-胃蛋白酶液来处理食线虫真菌,进行抗消化菌株筛选。在上述两种液体中的作用时间则是参照饲料在反刍动物瘤胃和真胃中停留的时间而确定的。

本研究的结果表明:大多数食线虫真菌不能耐受瘤胃液和盐酸-胃蛋白酶的作用,因此,体外抗消化筛选可以快速有效地排除一些不抗消化的真菌株,从大量减少通过动物试验筛选抗消化菌株所需的时间及物力、财力。

本试验筛选得到的食线虫真菌能否通过动物的消化道,以及对动物的致病性和毒性均还需通过动物试验加以验证。

参 考 文 献

- [1] Gronvold J, Henriksen S A, Larsen M *et al.* Vet Parasit, 1996, 64:47~64.
- [2] Gronvold J, Walstrup J, Nansen P *et al.* Vet Parasit, 1993, 48:311~325.
- [3] Larsen M, Nansen M P, Wolstrup J, *et al.* J. Helminth, 1991, 65:193~200.
- [4] Larsen M, Faedo M, Waller P J. Vet Parasit, 1994, 53:275~281.
- [5] Larsen M, Nansen P, Gronvold J *et al.* Vet Parasit, 1995, 54:321~330.