

# 口服少孢节丛孢菌孢子对家畜粪便中 线虫幼虫的杀灭研究

杨晓野, 吴彩艳, 杨莲茹, 刘珍莲

(内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 对捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*) 菌株进行了临床杀家畜寄生性线虫幼虫作用的研究。结果表明: 培养的少孢节丛孢菌分生孢子经口饲喂动物后, 对粪便中线虫幼虫的杀虫率分别可达 96.3% (羊) 96.5% (牛) 和 97.4% (马)。说明少孢节丛孢菌菌株分生孢子可通过家畜消化道, 并保持了其捕食寄生性线虫的能力。研究结果为捕食线虫性真菌的临床应用奠定了重要基础。

**关键词:** 生物防治; 线虫; 捕食线虫性真菌; 少孢节丛孢菌; 临床杀虫研究

中图分类号: S852.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)09-0927-04

捕食线虫性真菌是自然界一种尚未被充分认识和利用的宝贵资源。利用捕食线虫性真菌对家畜寄生性线虫进行防治, 对发展无污染的绿色畜牧产品具有极为重要的意义。随着化学驱虫药的各种弊端被不断认识, 这种生物防治技术将会越来越受到重视<sup>[1,2]</sup>。

国外在利用捕食线虫性真菌防治家畜线虫病方面已取得了一定进展, 证明用捕食线虫性真菌防治寄生性线虫自由生活阶段的幼虫是完全可行的, 用捕食线虫性真菌培养物饲喂动物, 可使牧场中感染性线虫幼虫的数量显著降低, 从而使放牧家畜的胃肠道寄生虫荷虫数减少, 脏器病变减轻, 增重率提高, 达到防治线虫病的目的<sup>[3-5]</sup>。

我国在这方面的研究起步较晚, 笔者实验室在捕食线虫性真菌生物学特性方面做了一些研究, 并初步进行了某些临床实际应用方面的探讨<sup>[6,7]</sup>。本研究在以前试验的基础上, 应用含有捕食线虫性真菌分生孢子的玉米粒培养物直接饲喂感染有寄生性线虫的家畜。从而了解其通过动物消化道后的存活情况, 测定并评价杀虫效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

FLC-3 型超净工作台; WGP-500 型隔水式电热恒温培养箱; 日本 OLYMPUS 倒置显微镜; 高压消

毒锅; 搪瓷盘; 玻璃培养皿(直径 90 mm); 进口琼脂粉; 吐温-80; 玉米粒及新鲜玉米粉。

试验动物: 绵羊(14 只)、马(2 匹)、牛(3 头)由内蒙古农业大学实验动物园提供。

少孢节丛孢菌菌株(*Arthrobotrys oligospora*)由内蒙古农业大学寄生虫学实验室保存。分生孢子玉米粒培养基和分生孢子洗脱液根据有关文献资料制备<sup>[6-8]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 少孢节丛孢菌菌株分生孢子的批量培养

将少孢节丛孢菌菌株接种于制备好的分生孢子玉米粒培养基中, 经 3 周, 待分生孢子大量形成后(图 1), 取 1 g 带分生孢子的玉米粒, 用分生孢子洗脱液洗脱孢子, 用白细胞计数器计数洗脱液中分生孢子的数量, 得出每克玉米粒中分生孢子的含量。

1.2.2 动物临床杀虫试验研究 对试验动物进行分组, 14 只羊分为 A、B、C、D 4 组, 其中 A 组为对照组; B、C、D 组为试验组, 羊平均体重约为 50 kg。牛、马体重按平均 500 kg 计算, 因数量较少, 不设对照, 分别为 E、F 组。具体分组情况和各组试验动物所喂分生孢子剂量见表 1。分生孢子剂量选择参照寄生虫学实验室“捕食线虫性真菌分离与生物学特性研究”课题组有关资料确定<sup>[7]</sup>。

试验前分别采集试验动物新鲜粪便各 15 g 放入平皿中, 于(20±1)℃恒温培养箱中培养, 每天翻动、加水, 15 d 后进行第三期幼虫的分离和观察, 根据有关资料<sup>[9]</sup>, 初步判定动物体所寄生的虫体种属。

按组分别给试验动物饲喂不同剂量含有分生孢子的玉米粒, 让其自由采食干净。然后, 分别在饲喂

收稿日期: 2004-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30260081)

作者简介: 杨晓野(1956-), 男, 呼和浩特市人, 博士, 教授, 主要从事寄生虫生物控制研究

表 1 试验动物分组及口服孢子剂量

Table 1 The groups of experimental animals and the conidia dosages administrated orally

组别	动物种类	含孢子玉米 粒质量/g	无孢子玉米 粒质量/g	分生孢子 总数/个
对照组	1 羊	0	15	0
	2 羊	0	15	0
	3 羊	0	15	0
试验组 B	1 羊	10	0	$6 \times 10^7$
	2 羊	10	0	$6 \times 10^7$
	3 羊	10	0	$6 \times 10^7$
	4 羊	10	0	$6 \times 10^7$
试验组 C	1 羊	15	0	$9 \times 10^7$
	2 羊	15	0	$9 \times 10^7$
	3 羊	15	0	$9 \times 10^7$
	4 羊	15	0	$9 \times 10^7$
试验组 D	1 羊	20	0	$12 \times 10^7$
	2 羊	20	0	$12 \times 10^7$
	3 羊	20	0	$12 \times 10^7$
试验组 E	1 牛	200	0	$12 \times 10^8$
	2 牛	200	0	$12 \times 10^8$
	3 牛	200	0	$12 \times 10^8$
试验组 F	1 马	200	0	$12 \times 10^8$
	2 马	200	0	$12 \times 10^8$

后第 48 小时戴粪兜, 间隔 12 h 后取粪便进行幼虫培养, 10 d 后, 用贝尔曼氏法分离幼虫, 统计克粪便幼虫数, 比较对照组与试验组的幼虫数, 得出捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌杀虫率, 评价杀虫效果。杀虫率按以下公式计算:

$$\text{杀虫率}(\%) = \frac{\text{对照组 LPG} - \text{试验组 LPG}}{\text{对照组 LPG}} \times 100\%$$

(LPG——克粪便幼虫数)

试验后 48 h 分别采集试验动物新鲜粪便各 1 g 接种于 0.4 g/L 玉米粉琼脂培养基上, 每个动物接种 3 个培养皿, 置 20 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养, 待菌丝布满培养皿时, 向培养皿中加入活的线虫第三期幼虫, 继续置于温箱中培养, 观察有无捕食器(菌环、菌网)的生成及有无虫体被捕获。

## 2 结果

### 2.1 试验动物体所寄生的线虫种类检查

通过对试验前粪便中的第三期幼虫检查, 试验动物羊牛和马消化道寄生的主要线虫为: 食道口线虫(*Oesophagostomum*)、毛圆线虫(*Trichostrongylus*)、

奥斯特线虫(*Oestertagia*)、细颈线虫(*Nematodirus*)、夏伯特线虫(*Chabertia*) 以及马圆形线虫(*Strongylus equinus*)、无齿圆形线虫(*S. edentatus*)、普通圆形线虫(*S. vulgaris*)、杯口属线虫(*Peteriostomum*)、三齿属线虫(*Truodontophorus*) 等。

### 2.2 少孢节丛孢菌杀虫效果评价

动物饲喂少孢节丛孢菌菌株分生孢子 48~ 60 h 后的粪便幼虫培养数据显示(表 2): 试验组羊与对照组羊相比, 其平均杀虫率为 96.3%; 在不同剂量试验组中, 试验组 B、试验组 C、试验组 D 的杀虫率分别为 96.4%、96.7% 和 95.8%, 其中试验组 C, 即 15 g 含孢子玉米剂量组( $9 \times 10^7$ ) 杀虫率最高。牛试验组和马试验组与饲喂分生孢子前相比, 平均杀虫率分别为 96.5% 和 97.4%。

表 2 少孢节丛孢菌临床粪便杀虫效力

Table 2 The killing efficiency of *Arthrobotrys oligospora* on larvae in faeces clinically

项目	孢子 剂量/个	喂前平均克 粪便幼虫数	喂后平均克 粪便幼虫数	杀虫 率/%	平均杀 虫率/%
对照组 A(羊)	0	352	363	0	0
试验组 B(羊)	$6 \times 10^7$	765	13	96.4	
试验组 C(羊)	$9 \times 10^7$	401	12	96.7	96.3
试验组 D(羊)	$12 \times 10^7$	771	15	95.8	
试验组 E(牛)	$12 \times 10^8$	171	6	96.5	96.5
试验组 F(马)	$12 \times 10^8$	346	9	97.4	97.4

### 2.3 试验后试验动物粪便少孢节丛孢菌菌株检查

试验后 48 h 试验动物的粪便在 0.4 g/L 玉米粉琼脂培养基上培养后, 有少孢节丛孢菌菌株的菌丝和分生孢子形成, 且加入虫体后, 有菌网、菌环生成, 并有虫体被捕获。说明经口喂入的少孢节丛孢菌菌株分生孢子顺利通过了动物消化道, 并在粪便中存活、发育, 且保持着其捕食活性(图 2)。

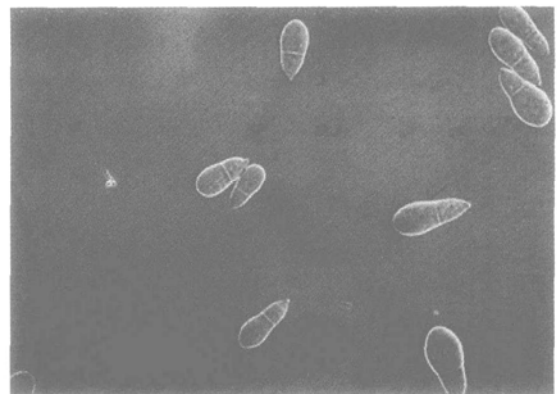


图 1 批量培养的少孢节丛孢菌分生孢子 400 ×

Fig. 1 The conidia of *A. oligospora* from cultivations

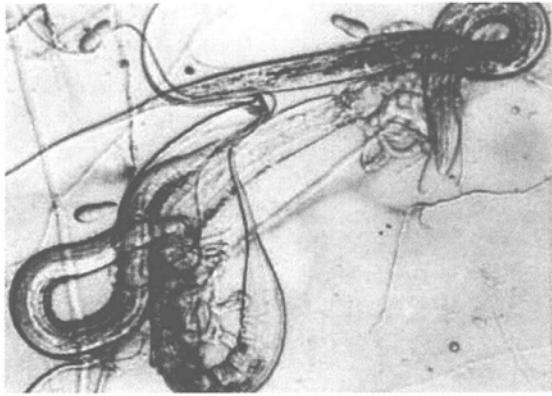


图 2 被少孢节丛孢菌捕获的虫体 200×  
Fig. 2 The larva trapped by *A. oligospora*

### 3 讨论与小结

国外曾有一些关于捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)捕食家畜寄生性线虫幼虫的研究报道。如 Pandey 和 Gronvold 曾报道少孢节丛孢菌对家畜艾氏毛圆线虫(*Trichostrongylus axei*)和奥氏奥斯特线虫(*Ostertagia ostertagi*)及肿孔古柏线虫(*Cooperia oncophora*)第三期幼虫的杀虫率均为 100%<sup>[10]</sup>,但他们的试验是利用人工培养的第三期幼虫在培养基上进行的。2001 年,杨晓野等人做了少孢节丛孢菌国内分离株在实验室条件下的粪便杀虫研究,与对照组相比,试验组线虫幼虫数量降低了 97.9%~98.7%<sup>[11]</sup>。

相关研究表明<sup>[12]</sup>:捕食线虫性真菌孢子的抵抗力远比菌丝强,因此,捕食线虫性真菌最理想的临床应用方法是将孢子饲喂给家畜,使其随同家畜的粪便和虫卵一起排出,从而发挥捕食寄生性线虫的作用。2002 年,笔者曾用梨形指环菌(*Dactylaria pyriformis*)菌株孢子悬浮液制剂,做了羊的口服杀虫试验,取得了 89.9%~92.8% 的临床杀虫效果<sup>[7]</sup>。

为了进一步寻求更为简便实用的给菌技术,笔者做了用少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)菌株批量培养的含分生孢子玉米粒给家畜自由采食的临床试验,其平均杀虫率分别为 96.3%(羊)、96.5%(牛)和 97.4%(马)。该结果及孢子口服饲喂动物后 48 h 试验动物的粪便培养情况,又一次证实少孢节丛孢菌分生孢子在通过动物消化道后,仍可存活。其随家畜粪便排出后,能在粪便中生长、发育,产生菌丝,并在孵化的线虫幼虫刺激下,产生了捕食器——菌环、菌网,从而导致了幼虫被捕致

死,起到了捕食寄生性线虫的作用。

本试验进一步验证了笔者以前粪便孢子数阈值结论的正确性<sup>[11]</sup>。从羊的不同剂量分生孢子口服饲喂组的杀虫结果可以看出:  $6 \times 10^7$  孢子/羊与  $9 \times 10^7$  孢子/羊和  $12 \times 10^7$  孢子/羊剂量在杀虫率上并无大的区别,  $6 \times 10^7$  孢子/羊剂量已达到了羊临床杀虫孢子数阈值。也就是说在此阈值后,再增加孢子数量,杀虫率也不再有明显提高。此结论对捕食线虫性真菌临床应用剂量的确定,具有重要参考价值。

从国内外有关资料中可以看出<sup>[2,13,14]</sup>:应用适合于本土自然环境条件下分离的捕食线虫性真菌菌株进行当地家畜寄生性线虫病防治是非常重要的,因为同一捕食线虫性真菌在不同地区可能存在着株的差异<sup>[5]</sup>。而且只有来源于本地区的菌株,将来才可能在本地区生产实际中应用。关于用含分生孢子玉米粒所做的临床动物寄生性线虫病防治试验研究在国内外尚未见有报道,此次笔者用自己分离出的少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)菌株批量培养的含分生孢子玉米粒所做的临床杀虫试验,取得了较好的效果,可以预见捕食线虫性真菌的开发应用前景是非常光明的。

### 参考文献:

- [1] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 寄生虫生物控制概述[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(7): 30~32.
- [2] Larsen M, Nansen P, Gronvold J, et al. Biological control of gastrointestinal nematodes—facts, future, or fiction? [J]. Veterinary Parasitology, 1997, 72: 479~492.
- [3] Larsen M, Nansen P, Henriksen S A, et al. Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses [J]. Veterinary Parasitology, 1995, 60: 315~320.
- [4] Larsen M, Faedo M, Waller P J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia [J]. Veterinary Parasitology, 1994, 53: 275~281.
- [5] 陈越,杜生明. 21世纪畜牧兽医学科发展展望[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 115~132.
- [6] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌少孢节丛孢菌 CIMH1 株捕食特性研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 1999, 7(2): 14~17.
- [7] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌杀动物寄生性线虫研究[A]. 中国畜牧兽医学会 2003 年学会年会论文集[C]. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2003.

- 449~ 452.
- [8] 杨晓野, 杨莲茹, 刘珍莲, 等. 捕食线虫性真菌的分离培养及分布规律[J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (4): 344~ 346.
- [9] 英国农业、渔业和粮食部. 兽医寄生虫学实验室技术手册[M]. 刘钟灵, 译. 武汉: 华中农学院, 1982. 9~ 13.
- [10] Gronvold J, korsholm H, wolstvup J, et al. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus[J]. *Journal of Helminthology*, 1985, 59(2): 119~ 125.
- [11] 杨晓野, 杨莲茹, 刘珍莲, 等. 捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌体外杀寄生性线虫幼虫的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35 (3): 334~ 338.
- [12] 禹旺盛, 刘珍莲, 杨晓野, 等. 捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌理化特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25 (6): 462~ 465.
- [13] Krecek R C, Guthrie A J. Alternative approaches to control of cyathostomes: an African perspective[J]. *Veterinary Parasitology*, 1999, 85: 151~ 162.
- [14] 杨晓野, 汪明, 杨莲茹, 等. 捕食线虫性真菌对寄生性线虫的生物控制[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40 (5): 44~ 46.
- [15] 杨莲茹, 杨晓野, 刘珍莲, 等. 捕食线虫性真菌 18S rDNA 基因序列与种系发生关系研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35 (3): 329~ 333.

### Study of Conidia of *Arthrobotrys oligospora* Administrated Orally on Killing the Nematode Larvae in Faeces of Domestic Animals

YANG Xiaoye, WU Caiyan, YANG Lianru, LIU Zhenlian  
(College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia  
Agricultural University, Huhehot 010018, China)

**Abstract:** The clinical capacity of the nematode-trapping fungus — *Arthrobotrys oligospora* to kill parasitic nematodes of livestock was studied. The experiment indicated that the killing rate was 96.3% (sheep), 96.5% (cattle), 97.4% (horse) respectively after feeding the conidia to animals, which showed that the fungus could pass through the digestive canal of animals and have preserved its trapping capacity. The result established an important foundation for the clinical application of nematode-trapping fungi.

**Key words:** biological control; nematodes; nematode-trapping fungi; *Arthrobotrys oligospora*; clinical study of killing nematodes

## 动物疫情速递

### 1. 蒙古发生候鸟禽流感

蒙古 2005 年 8 月 8 日向 OIE 报告了其境内 Huvsgel 省 Alag-Ederne 郡 Erhel 湖地区发生候鸟禽流感。2005 年 8 月 2 日该地区紧急上报疫情情况。8 月 7 日开始了实验室诊断。本次疫情涉及野鸭、鹅、天鹅, 共发现 80 只死禽。诊断包括临床诊断和实验室诊断。实验室诊断在中央兽医实验室进行, 包括免疫膜过滤试验和 RT-PCR。

此次禽流感由 A 型禽流感病毒引起, 亚型鉴定尚在进行中。采取的控制措施有: 检疫、销毁死禽和消毒。

### 2. 博茨瓦纳发生疑似口蹄疫

博茨瓦纳 2005 年 8 月 15 日向 OIE 报告了疑似口蹄疫疫情。疫情出现在博茨瓦纳西北地区卡萨内地区的 Pandamatenga。相关部门在该地区进行例行的年度口蹄疫免疫和调查中发现牛(尤其是成年牛)出现疑似临床症状。目前有 29 例疑似感染牛, 受口蹄疫威胁的牛约有 1 300 头。

由于此次疫情发生在口蹄疫控制区, 因此此次疫情应该不会影响博茨瓦纳的口蹄疫状况和肉牛贸易。

样品报告同时已送往博茨瓦纳疫苗研究所检验。

采取的控制措施有: ①隔离疑似患畜并进行检疫; ②实施生物安全措施; ③博茨瓦纳警察和部队协助相关部门封锁疑似区域。进一步的控制措施有待实验室确诊和病毒鉴定结果而定。

### 3. 蒙古发生 A 型口蹄疫

蒙古 8 月 18 日向 OIE 报告发生 A 型口蹄疫。疫情发生在蒙古东部多尔勒德省 Bayantumen 郡, 2005 年 8 月 12 日该地区紧急上报了疫情。共有 118 头牛感染。实验室诊断已于 8 月 17 日进行。采取的控制措施有: 检疫、扑灭、限制移动、隔离和消毒。