

鸡舍环境镰孢菌的定量研究

王雅玲, 彭红艳, 王钰卓, 李婷婷, 胡海锐, 宋莉, 郭静, 吴迪

(1. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600; 2. 沈阳农业大学, 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的] 对鸡舍空气和周围基质(饲料、粪便、灰尘、土壤)中镰孢菌(*Fusarium*)的浓度和分布进行定量研究, 为控制从业人员和禽类*Fusarium*感染及预警提供科学依据。[方法] 采用6级Anderson空气微生物采样器和曝皿法采集空气中样本, 采用无菌袋随机采取周围基质中样本, 进行实验室培养、计数、纯化。[结果] 共得到镰孢菌分离株717株, 以灰尘中*Fusarium*的浓度最高($2.8 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cfu/g, 平均为 8.8×10^5 cfu/g)。[结论] 空气中的镰孢菌分布与土壤中和灰尘中镰孢菌相关性较大。

关键词 镰孢菌; 空气; 基质; 鸡舍

中图分类号 S831.4+5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15900-02

Quantitative Study on *Fusarium* in Chicken House Environment

WANG Ya-ling et al (College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract [Objective] The aim of this study is to quantitatively analyze the *Fusarium* concentration and distribution in the air and the surrounding substrates (feed, feces, dust, soil) in the chicken house to provide a scientific basis for the control and early warning of *Fusarium* infection in poultry and practitioner. [Method] Air samples collected by a 6-stage Anderson air microorganisms sampler and exposed culture plates as well as substrate samples gathered by aseptic bags were cultured, counted and purified in the lab. [Result] 717 strains of *Fusarium* isolates were obtained and the dust had the highest *Fusarium* concentration among the samples ($2.8 \times 10^5 - 1.5 \times 10^6$ cfu/g with an average of 8.8×10^5 cfu/g). [Conclusion] The *Fusarium* distribution in the air was in high correlation with those in soil and dust.

Key words *Fusarium*; Air; Substrate; Chicken house

镰孢菌(*Fusarium*)是自然界中普遍存在的一类真菌, 主要通过生长繁殖过程中产生的次级代谢产物(如T-2毒素等)的作用对健康造成危害。近年来, 因*Fusarium*引起的马、牛、猪、雏鸡等中毒现象频繁发生^[1], 造成大批牲畜死亡或淘汰, 给国民经济造成巨大损失, 引起了人们的极大关注。空气中可吸入及饲料中可食入的*Fusarium*种类和浓度是导致人与禽类呼吸道菌类病传播的关键因素, 目前已有研究证明鸡舍空气中可分离到产毒镰孢菌株和T-2毒素, 长期暴露在其污染环境中可对人与动物造成潜在危害^[2]。还有调查表明, *Fusarium*已经成为感染角膜的首位致病菌^[3], 且难以治愈。该试验对鸡舍镰孢菌的浓度和分布进行定量研究, 旨在为控制*Fusarium*感染及预警提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、虎红(孟加拉红)氯霉素琼脂培养基(RBC)、马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)和蔗糖Nrenberg琼脂培养基(SNA)。

1.1.2 仪器。FA-1型6级Anderson空气微生物采样器(辽阳市应用技术研究所)、BX51显微镜(日本OLYMPUS)。

1.2 采样方法 于1月份在室温23℃, 相对湿度64%的雏鸡舍采样。空气采样。采用2种方法进行, 一是采用6级Anderson空气微生物采样器^[4]采样, 各级的有效截流直径(A~F级)依次为8.20、6.00、3.00、2.00、1.00、0.65 μm; 二是采用曝皿法(培养基为PDA)^[2]采样, 采样持续时间有5、7 min 2种。采用2种方法依次在距地面0.20、0.90、1.80 m高度处采样。基质采样。利用无菌袋随机取周围基质(饲料、粪便、灰尘、土壤)各10 g, 其中灰尘分4个高度(距地面0、0.72、

1.44、2.16 m处)取样。

1.3 镰孢菌的分离、纯化和鉴定 采用PDA培养基和RBC培养基为收集培养基^[5], 基质样本稀释2个倍数(100、1 000倍)培养, 3~7 d后, 再采用镰孢菌鉴定培养基——PSA培养基和SNA培养基^[5]培养3 d, 在显微镜下观察菌落形态和产孢结构, 根据形态学特征将其鉴定到种。

1.4 数据处理

1.4.1 Anderson采样器测定的气载*Fusarium*浓度。以每立方米空气中菌落形成单位数(colony forming unit, cfu)表示, 空气流量是28.3 L/min^[6], 按照公式(1)进行计算。

$$Y_1(\text{cfu}/\text{m}^3) = \frac{\text{总菌落数}}{28.3 \text{ L}/\text{min} \times \text{采样时间}(\text{min})} \times 1000 \quad (1)$$

1.4.2 曝皿法采样测定的气载*Fusarium*浓度。类似于大气真菌粒子沉降量与大气真菌粒子含量的关系, 其校正系数 $L = a w(\rho_p)^{-1/2} (\rho_p / \rho_a)^{1/3} N^{1/3}$ ^[7](经计算曝皿5 min的校正系数 $L_5 = 13.37$; 曝皿7 min的校正系数 $L_7 = 18.72$, 计算方法参见文献[8]), 按照公式(2)进行计算。

$$Y_2(\text{cfu}/\text{m}^3) = L \times N \frac{5000}{A \times t} \quad (2)$$

式中: A为所用平板面积(cm²); t为平板曝露于空气中的时间(min); N为经培养的培养板生长的菌落数(cfu)。

1.4.3 基质中*Fusarium*浓度。稀释2个倍数培养(n_1 、 n_2 分别代表稀释100、1 000倍培养时培养皿中镰孢菌的分离株数), 按照公式(3)进行计算。

$$C(\text{cfu}/\text{g}) = \frac{n_1 \times 100 \times 10 + n_2 \times 1000 \times 10}{2} \quad (3)$$

1.4.4 相关性分析及线性分析。将数据输入SPSS分析软件, 运用Correlate中的Bivariate Correlations进行相关性分析, 运用Regression目录下Linear中的Forward进行线性分析。

2 结果与分析

2.1 鸡舍空气中镰孢菌的组成和浓度 从48个空气样本中共获得真菌1 162株, 其中镰孢菌分离株为23株, 分离率为1.9%; 其中Anderson采样器采样分离株为19株。Anderson

基金项目 国家自然科学基金(30771584)。

作者简介 王雅玲(1965-), 女, 辽宁凤城人, 博士, 副教授, 从事镰孢菌及其次级代谢产物研究。

收稿日期 2008-09-28

采样器在3个高度处的取样结果表明:距地面0.2、0.9 m处的镰孢菌主要分布在第2级(6.00 μm左右),而1.8 m高度处的镰孢菌主要分布在第5级(1.00 μm左右)(图1)。3~6级(3.00~0.65 μm)采集的镰孢菌占镰孢菌分离株总量的34.8%(8/23),可吸入到呼吸道深部,可能对人和动物的呼吸道造成较大危害。

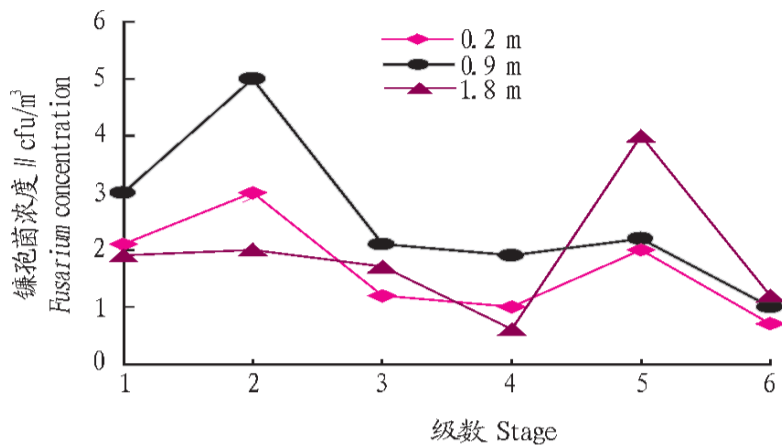


图1 Anderson 采样器各级镰孢菌的分布

Fig.1 Fusarium distribution in each stage of Anderson sampler

2.2 鸡舍各基质中镰孢菌的组成和浓度 从30个稀释的基质样本中共获得真菌2 240株,其中镰孢菌分离株694株,占基质真菌总数的31.0%;6个土壤样本中镰孢菌的浓度为 $3.7 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ cfu/g,平均浓度为 7.4×10^4 cfu/g;4个饲料样本中镰孢菌的浓度为 $4.3 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ cfu/g,平均浓度 1.5×10^5 cfu/g;4个粪便样本中镰孢菌的浓度为 $6.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ cfu/g,平均浓度 2.8×10^5 cfu/g;16个灰尘样本中镰孢菌的浓度为 $2.8 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cfu/g,平均浓度 8.8×10^5 cfu/g,其中灰尘中镰孢菌浓度最高。

2.3 空气与各基质中镰孢菌分布的相关性及线性分析 根据“1.4.4”中方法分析空气中与4种基质中镰孢菌浓度的相关性,发现气载镰孢菌浓度与土壤、灰尘中镰孢菌浓度相关性较大(表1),说明空气中镰孢菌大部分来源于周围的土壤、灰尘。同时分析空气与各个基质镰孢菌浓度的线性关系,建立相关性方程: $Y = 0.075 X_1 - 0.002 X_2 + 0.003 X_4$ (其中,Y代表空气中的镰孢菌浓度; $X_1 \sim X_4$ 分别代表土壤、饲料、粪便、灰尘中的镰孢菌浓度,式中无 X_3 是因为相关系数太小,电脑处理时自动忽略)。

表1 空气与4种基质中镰孢菌浓度的相关性分析

Table 1 Correlation of Fusarium concentration between air and 4 kinds of substrates

项目 Item	土壤 Soil	饲料 Feed	粪便 Feces	灰尘 Dust	空气 Air
土壤Soil	1.000	0.981*	0.912	0.999**	0.996**
饲料Feed	0.981*	1.000	0.816	0.973*	0.980*
粪便Feces	0.912	0.816	1.000	0.927	0.908
灰尘Dust	0.999**	0.973*	0.927	1.000	0.995**
空气Air	0.996**	0.980*	0.908	0.995**	1.000

注:*表示在0.05水平显著相关,**表示在0.01水平显著相关(双尾检验)。

Nte:* means significant correlation at 0.05 level and ** means significant correlation at 0.01 level (two-tailed test).

2.4 鸡舍中镰孢菌的种类及其分布 鸡舍环境镰孢菌分离株中串珠镰孢菌(*Fusarium moniliforme*)占17.4%(125/717);多隔镰孢菌(*Fusarium decemcellulare*)占11.7%(84/717);尖孢

镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)占0.9%(6/717),未知镰孢菌占70.0%(502/717)。3个高度空气中镰孢菌分布与4个高度灰尘中镰孢菌分布规律相当一致,证明空气中镰孢菌可能来自灰尘,因为空气中不存在镰孢菌生长繁殖所需的营养物质,其存在必定依赖于周围基质。

3 讨论与结论

(1) 空气中镰孢菌不仅可经粘膜进行侵染,更重要的是可通过呼吸道随吸入气流侵入造成深部感染,特别是空气中活性产毒镰孢菌吸入体内后还能不断产生毒素^[7],诱发一定的病变^[9-10]。Anderson采样器可模拟收集空气中入侵呼吸道不同部位的粒子。6级Anderson第1~2级的*Fusarium*粒子($d > 6.00 \mu\text{m}$)可沉着在小支气管内,第3~6级($d < 5.00 \mu\text{m}$)的*Fusarium*粒子可直接侵入肺泡^[11-12]。该试验中3~6级镰孢菌粒子占总量的34.8%(8/23),证明该鸡舍空气中镰孢菌对呼吸道潜在的危害较大,应采取提高空气湿度等控制措施。

(2) T2毒素的浓度主要取决于产毒镰孢菌孢子的数量^[13-14],也是决定镰孢菌危害程度的关键因素。该试验仅得出镰孢菌数量、分布与环境的关系,但并非所有镰孢菌都产毒,因此应进一步对产毒镰孢菌进行研究,以期得到更为直接和准确的结果。

(3) 对空气与各个基质中镰孢菌分布的相关性分析表明,空气中的镰孢菌分布与灰尘、土壤中镰孢菌相关性较大,因此,建议对鸡舍环境采取增加空气湿度或勤打扫等措施,以降低空气中菌的来源。

(4) 由“2.3”中分析得出的线性方程可代表该鸡舍环境中空气与其他4种基质中镰孢菌浓度的相关线性关系,即可以通过测定4种基质中镰孢菌的浓度推算出空气中镰孢菌的浓度。因为空气中菌的浓度相对而言较难测定,而其对人的危害又是极其严重的,因而此方程具有一定的实用性,简化了研究和检疫的工序,但考虑到季节、取样环境以及人为误差等因素的影响,其普遍性关系还有待于在不同季节、不同鸡舍环境以及正确的操作下做进一步研究。

(5) 该试验中仅鉴定出镰孢菌的3个种,可能与该次试验采样样本数量少,采样时间为冬季以及人为误差等因素有关,同时说明了镰孢菌的形态学鉴定难度大,今后须结合分子生物学方法进行研究。

参考文献

- [1] 庞彦芳,冯定远.广东饲料微生物污染状况的研究[J].粮食与饲料工业,2000(6):39-41.
- [2] 王雅玲,吕国忠,柴同杰,等.鸡舍空气中真菌浓度及多样性研究[J].菌物学报,2005(4):510-516.
- [3] SHAWARINN J, EFFAT O, MANICKAM R, MOHIAR I. *Fusarium* sp. in severe contact lens related fungal keratitis[J]. International Journal of Ophthalmology, 2008, 4: 666-669.
- [4] YOSEF A D. Application of Anderson sample in studying airborne fungus in San Anorio, Texas[J]. Mycopathologia, 1970, 42(3/4): 293-298.
- [5] 王雅玲.养殖环境真菌气溶胶及相关真菌毒素的检测[D].泰安:山东农业大学,2006:11-214.
- [6] 胡庆轩,徐秀芝,刘敏霞,等.沈阳市室内空气真菌粒子的研究[J].云南环境科学,1996,15(1):16-19.
- [7] 许钟麟.沉降菌法和浮游法关系初探[J].中国公共卫生,1993(4):160-162.
- [8] 孟昭赫,孙玉书,角田广,等.真菌毒素图解[M].北京:人民卫生出版社,1983:1-244.

3 结论

(1) 5 批禽霍乱、新城疫二联油乳剂灭活疫苗对 60 日龄鸭和鹅 2 倍使用剂量的安全性试验结果表明:鸭和鹅均未出现由疫苗引起的任何局部和全身不良反应,且全部健活。证明该二联苗用于免疫水禽(鸭、鹅)安全可靠,无任何毒副作用。

(2) 5 批二联苗对 90 日龄鸭和鹅的免疫效力试验结果表明:免疫后 3 周,5 个免疫组鸭、鹅的 ND H 抗体效价均

4 log₂, 对照组均 2 log₂;免疫组 NDV 攻毒保护率均为 100%, APM 攻毒保护率为 66.7%~83.3%。说明该二联苗免疫鸭和鹅等水禽,能获得较好的禽霍乱和新城疫免疫效果。

(3) 在水禽免疫的研究中,关于副粘病毒和禽多杀性巴氏杆菌目前只有相关单价疫苗的免疫效果报道^[7-8]。该研究为禽霍乱、新城疫二联油乳剂灭活疫苗免疫鸭和鹅等水禽提供了理论依据,其临床应用效果有待于田间试验的进一步验证。

表1 鸭的免疫效力试验

Table 1 The results of immune efficacy test on ducks

组别 Group	日龄 d Age	数量 只 Number	免疫剂量 rh Immunizing dose	ND H 抗体 xlog ₂ ND H antibody titer		NDV 攻毒保护率 % (保护数 攻毒数) Protection rate against NDV (Protective number/ challenge number)	APM 攻毒保护率 % (保护数 攻毒数) Protection rate against APM (Protective number/ challenge number)
				免疫前 Before immunization	免疫后3周 3 weeks after immunization		
2001-01	90	16	1	2	4.2 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
2001-02	90	16	1	2	4.6 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
2001-03	90	16	1	2	4.2 (4~5)	100 (10/10)	66.7 (4/6)
2001-04	90	16	1	2	4.4 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
2001-05	90	16	1	2	4.8 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
对照组 Contrl group	90	8	-	2	2	0 (0/5)	0 (0/3)

表2 鹅的免疫效力试验

Table 2 The results of immune efficacy test on geese

组别 Group	日龄 d Age	数量 只 Number	免疫剂量 rh Immunizing dose	ND H 抗体 xlog ₂ ND H antibody titer		NDV 攻毒保护率 % (保护数 攻毒数) Protection rate against NDV (Protective number/ challenge number)	APM 攻毒保护率 % (保护数 攻毒数) Protection rate against APM (Protective number/ challenge number)
				免疫前 Before immunization	免疫后3周 3 weeks after immunization		
2001-01	90	16	1	2	4.4 (4~5)	100 (10/10)	66.7 (4/6)
2001-02	90	16	1	2	4.2 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
2001-03	90	16	1	2	4.6 (4~5)	100 (10/10)	66.7 (4/6)
2001-04	90	16	1	2	4.2 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
2001-05	90	16	1	2	4.4 (4~5)	100 (10/10)	83.3 (5/6)
对照组 Contrl group	90	8	-	2	2	0 (0/5)	0 (0/3)

参考文献

- [1] 邵华斌,杨峻,刘泽文,等.禽霍乱、新城疫二联油乳剂灭活疫苗研究 I 报[J].湖北农业科学,2006(5):647-649.
- [2] 邵华斌,杨峻,刘泽文,等.禽霍乱、新城疫二联油乳剂灭活疫苗研究 II 报[J].湖北农业科学,2007(3):433-435.
- [3] 耿金华,蔺月英.鸡、鸭、兔巴氏杆菌病交叉感染的诊治[J].畜牧与兽医,1995(4):177-178.
- [4] 李康然.水禽疾病的一些新问题[J].广西畜牧兽医,2000(2):40-43.
- [5] WANG HL, YANG J, SHAO HB, et al. Studies on the inactivated oil emulsion binary vaccine against Newcastle Disease and Fowl Cholera()—Safety and immune efficacy test of vaccine on duck and goose[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5):106-108.
- [6] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准 2001 年版[M]. 北京:中国农业出版社,2001:57-58,62-63.
- [7] 凌明亮. 鹅巴氏杆菌油乳剂灭活疫苗的研制与应用效果[J]. 畜牧兽医科技信息,2005(3):33-34.
- [8] 李文良,冯太兰,戴亚斌,等. 鸡新城疫疫苗对鹅副粘病毒病免疫效果观察[J]. 中国预防兽医学报,2008(6):478-481.
- [9] 李广生. 镰孢菌 F2 毒素对培养软骨细胞的影响[J]. 生物化学与生物物理进展,1993,20(5):364-368.
- [10] 杨建伯. 镰孢菌 F2 毒素致鸡雏关节软骨病变观察[J]. 中国地方病学杂志,1994,13(1):1-2.
- [11] GUIDO F, WOLFGANG D. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental[J]. Occupational and Indoor Hygiene Arch Microbiol, 2003, 179:75-82.
- [12] ABDULRAHMANS A. Viable airborne fungi in Riyadh, Saudi Arabia[J]. Aerobiologia, 1999, 15(2):121-130.
- [13] PENG HY, WANG YL, SUN LJ, et al. Quantitative study on the Fusarium in chicken house environment[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5):102-105.
- [14] HSCHER G, MULLER T, SCHWALBE R, et al. Exposure to airborne fungi, MOC and mycotoxins in bio-waste handling facilities[J]. Int J Hyg Environ Health Res, 2000, 203:97-104.
- [15] MA Y, LI J, WANG B, et al. Study on the quantity dynamic changes of heterobacteria and vibrios in larvae industrialized culture system[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):116-121.

(上接第 15901 页)