

张洪波, 张春霞, 孙亚丽, 等. 高原地区捕食线虫性真菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 222–224.

高原地区捕食线虫性真菌的分离与鉴定

张洪波¹, 张春霞², 孙亚丽¹, 多杰才旦¹, 康 明¹

(1. 青海大学农牧学院动物医学系, 青海西宁 810016; 2. 青海省畜牧兽医职业技术学院动物医学系, 青海西宁 812100)

摘要:采用玉米琼脂粉培养基对祁连县、共和县和泽库县 4 个地区的不同土壤样品进行捕食线虫性真菌的分离, 并利用藏绵羊马歇尔线虫第 3 期幼虫诱导真菌捕食器官的产生。结果表明, 从祁连县土壤样品中分离到 1 株捕食线虫性真菌, 根据菌丝及捕食器官的形态特征, 鉴定为少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)。

关键词:高原地区; 捕食线虫性真菌; 分离鉴定

中图分类号:S853.32

文献标志码:A

文章编号:1002–1302(2014)08–0222–02

真菌是一类具有真正细胞核、能产生孢子的微小生物, 一般都进行有性繁殖和无性繁殖。捕食线虫性真菌是自然界的宝贵资源, 广泛分布于土壤、动物粪便、动植物残体、苔藓及植物根中, 营腐生或寄生生活。捕食线虫性真菌在土壤中处于低代谢状态, 初期营腐生生长, 后期由于营养竞争进入捕食阶段, 把线虫作为主要营养来源或作为腐生生活的补充。目前, 已发现杀线虫性真菌 200 多种, 可分为 3 种类型: 第 1 类是捕食线虫性真菌, 这类真菌能产生捕食线虫性结构(器官)如黏性菌环(收缩或不收缩)、黏性菌丝、黏性菌网、黏性菌结等^[1], 通过捕食性器官捕获并杀死线虫幼虫^[2–3], 其最大优点是对人和动物安全无害^[4–5]; 第 2 类是内寄生性真菌, 这类真菌借助分生孢子来感染线虫, 在线虫体内生长形成菌体, 消化吸收掉线虫; 第 3 类是包裹体和根瘤线虫寄生性真菌, 主要利用营养菌丝来进攻线虫卵或雌虫。捕食线虫性真菌在自然界中分布最广泛, 其特有的捕食线虫性结构特征明显, 较其他 2 种类型易于在培养基上进行观察、分离和培养。

寄生虫病严重危害着畜牧业的发展, 而胃肠道线虫病又是其中一种主要的寄生虫病, 分布广、危害大, 造成的畜牧业经济损失巨大。目前, 对线虫病的防治主要依赖于化学药物。反复使用同一种化学药物易产生抗药性虫株, 还会造成动物性食品的药物残留, 对人体健康带来危害, 另外, 药物代谢的某些有害成分排出家畜体外, 也会对环境造成污染。生物防治因其节能、环保、低毒的特点而被人们广泛研究, 国内外普遍重视利用杀线虫性真菌对寄生虫性线虫病的防治^[6–8], 其中, 利用线虫天敌——捕食线虫性真菌^[9]进行生物防治研究是最多的。近年来, 我国在动物寄生虫病的生物防治领域研究取得一定的进展, 杨晓野等对捕食线虫性真菌的分离、鉴定及生物防治等进行了大量研究^[2–4]。但是, 对于高原地区捕食线虫性真菌的研究及生物防治尚未见报道。现对青海省祁连县、共和县和泽库县 3 个高原地区的不同土壤样品, 开展捕食线虫性真菌的分离和鉴定, 为青海省牛羊线虫病的防制

提供基础数据, 达到生物控制牛羊寄生虫病的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 设备及药品 隔水式恒温培养箱; 普通显微镜; 搪瓷盘; 直径 90 mm、高 60 mm 的玻璃培养皿。琼脂粉(北京奥博星生物技术责任有限公司, 批号: 20121308); 青霉素(华北制药股份有限公司, 批号: s1110609); 盐酸(白银良友化学试剂有限公司, 批号: 050315); 氢氧化钠(天津市化学试剂三厂, 批号: 850629); 氯化钠(北京化工厂, 批号: 821212); 新鲜玉米粉(超市购买)。

1.1.2 玉米粉琼脂培养基(CMA) 称取新鲜玉米粉 40 g, 加蒸馏水 1 000 mL, 微火煮沸 1 h, 补蒸馏水至 1 000 mL, 多层纱布过滤; 取滤液 5 mL, 加蒸馏水 495 mL, 调 pH 值至 6.0 ~ 6.2, 加琼脂粉 20 g, 经 0.68 MPa 高压灭菌 20 min 后倾注于灭菌玻璃培养皿。

1.1.3 玉米粉琼脂单抗培养基(SACMA) 配制方法同玉米粉琼脂培养基, 经 0.68 MPa 高压灭菌 20 min 后, 冷却至 50 ~ 60 ℃, 每 1 mL 玉米粉培养基中加入青霉素 200 IU, 混匀后再倾注于灭菌玻璃培养皿中, 备用。

1.1.4 土壤样品及绵羊粪便的采集 土壤采于青海省祁连县、共和县、湟源县和泽库县 4 个地区, 共 40 份土样。其中, 祁连县采集 10 份土样, 土质湿润; 湟源县采集 3 份土样, 土质较湿润; 日月山采集 4 份土样, 土质干燥; 青海大学农牧学院动物房依次在树根、圈口、墙根采集 3 份土样, 墙根土质干燥, 其他 2 份土质较湿润; 共和县采集 10 份土样, 土质较湿润; 泽库县采集 10 份土样, 土质较湿润。线虫幼虫培养物质使用采自青海大学农牧学院试验动物房饲养的绵羊粪便, 利用线虫幼虫培养法得到第 3 期幼虫备用。

1.1.5 分生孢子洗脱液 取蒸馏水 500 mL, 加入 4.5 g NaCl 配成生理盐水, 分装于 250 mL 盐水瓶中, 经 0.68 MPa 高压灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 第 3 期线虫幼虫的培养 取新鲜羊粪, 捏碎后加入少量蒸馏水混匀, 捏成山丘状, 放在大平皿中将平皿盖压紧, 加蒸馏水至平皿 2/3 处, 于 25 ~ 27 ℃ 通风温箱中培养 5 ~ 7 d。从绵羊真胃中挑取马歇尔属或奥斯特属线虫雌虫, 从子宫中

收稿日期: 2013–10–29

基金项目: 青海省农牧厅项目(编号: 2010–QNMY–5)。

作者简介: 张洪波(1990—), 男, 硕士, 主要从事动物寄生虫学研究。

E-mail: 704538219@qq.com。

通信作者: 康 明, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物寄生虫学研究。

E-mail: kangming24282003@yahoo.com.cn。

挤出虫卵,置于每平皿加 2~4 粒盐的蒸馏水中,于 25~27℃ 通风温箱中培养 7~10 d,每隔 2~4 h 搅动 1 次虫卵。

1.2.2 捕食线虫性真菌的分离鉴定 土壤样品以“十”字形撒在玉米粉琼脂平板培养基中,每份土样接种 3 皿,并在每个玉米粉琼脂平板培养基内加入约 50 条线虫第 3 期幼虫;将培养皿置于搪瓷盘内,保持一定湿度,在 (20 ± 1) ℃ 温箱内培养,每周用普通显微镜观察 1 次,并加 1 次幼虫,诱导真菌捕食器官;在 3~5 d 后若出现捕虫现象,利用显微镜 ($10 \times$ 、 $40 \times$) 观察并拍摄照片,根据出现捕食线虫的特征性结构菌环及菌网,参照李天飞等资料^[10]进行分类鉴定。

1.2.3 菌株的纯化 对具有捕虫现象的分离菌株,在显微镜下用接种环钩取,接种到玉米粉琼脂培养基上,27℃ 通风温箱培养 3~5 d,观察真菌生长情况。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学特征

分离菌株的菌丝发达,呈较密集的丝状体,菌丝无色有隔;线虫幼虫存在时,菌丝上形成菌环;分离菌株分生孢子梗细长、无色、直立、不分枝,分生孢子围绕着分生孢子梗轮状排列生长,一般在 2 轮以上,分生孢子在孢子梗顶部密集成簇状;分生孢子呈倒卵形,形态丰满,无色双胞,双胞分隔处向内收缩,远端(上端)细胞较大,孢子基部(下部)较尖(图 1)。

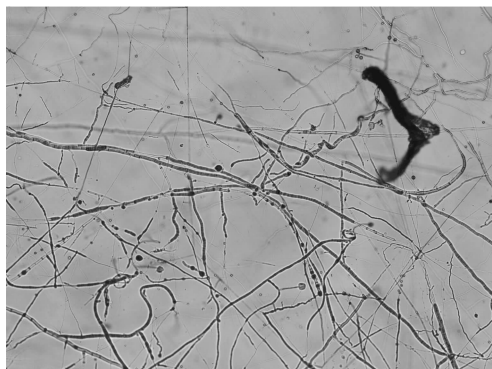


图1 分离菌株的形态(400×)

2.2 菌株捕食器官特征

由图 2 可见,分离菌株产生的捕食器官为菌环,线虫幼虫被套住后,在菌环和菌丝内不断挣扎,并只能在原地蠕动,而不能脱出菌环和菌网,有的幼虫躯体上套有 1 个菌环,而有的则被菌网中的几个菌环套住;幼虫被套 4 h 后失去运动能力,继续观察数日,可见幼虫躯体一天比一天小,内容物逐渐稀少,最后形成空壳,时间再久则完全消失。

2.3 捕食线虫性真菌的种属鉴定

通过显微镜观察,根据分离菌株的主要形态学特点,即菌丝无色有隔、分生孢子梗直立不分枝、分生孢子无色双胞、菌丝经幼虫诱导可产生菌环,鉴定其为节丛孢属的少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)。

3 结论与讨论

分离的高原地区捕食线虫性真菌菌丝无色有隔;幼虫存在时,菌丝上形成菌环;分生孢子梗细长、无色、直立、不分枝;分生孢子围绕着分生孢子梗轮状排列生长,分生孢子在孢子

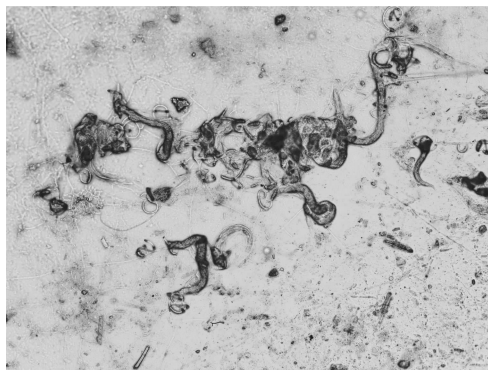


图2 真菌捕食线虫(400×)

梗顶部密集成簇状。这与杨晓野等研究结果^[2-3]基本一致,仅在生物学特性上稍有不同,可能与真菌株的地理分布有关。

寄生虫病的生物学防治因其节能、环保、低毒而被人们所重视,这些优点都是化学药物防治所无法达到的。通过对高原地区捕食线虫性真菌的分离鉴定和生物学特性研究,为开发高效、稳定的生物杀线虫制剂提供理论基础,为捕食线虫真菌的分子机制研究提供良好的试验基础数据。分离菌株(少孢节丛孢菌)如果能正常通过动物体内酶、消化液对其的破坏作用,能在体内随羊粪排出体外仍然保持活性,仍具有捕虫活力,对该菌株制成药丸大量投服于动物体内,以防制动物线虫病将大有益处,有必要进一步开展相关研究。

在真菌的分离培养过程中,必须加入活的线虫第 3 期幼虫,这既可以诱导捕食线虫性真菌生长发育,又可以诱导菌株产生捕食性器官——菌环,从而依据这些特征进行分离菌株种属的鉴别。对于捕食线虫性真菌培养基,国际上普遍采用玉米粉琼脂(CMA)以 1:10 稀释制备而成,而这种玉米粉琼脂国内没有。杨晓野等为寻找 1 种适宜捕食线虫性真菌生长发育的培养基,进行了许多类似培养基的比较试验,确定出玉米粉 0.4 g/L CMA 培养基为捕食线虫性真菌最佳培养基^[2-4]。本试验引用了此种培养基,真菌培养达到理想效果。

另外,土壤样品在进行真菌培养前要求充分碾碎,不应有大颗粒的存在,以利于撒布于培养基上培养。土壤样品以“十”字形分布于培养基的方法有利于真菌生长,而其他撒布方法如随便倒撒或堆积的分布,真菌生长分布情况不好,试验效果欠佳。

本试验中以祁连县土壤样品中分离出捕食线虫性真菌的概率较高,这说明捕食线虫性真菌的分布可能受不同地方土质、气候等理化因素的影响,主要存在于潮湿、阴暗、腐殖质较多的环境中,在温暖季节,从树木下、花园、果园等地方的土壤中也易获得菌株。

参考文献:

- [1] Nansen P, Grønvald J, Henriksen S A, et al. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes [J]. *Veterinary Parasitology*, 1988, 26(3/4): 329-337.
- [2] 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): 16-19.

管远红,张家禾,秦 枫,等. 4 种中药复方对小鼠的免疫增强作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):224-226.

4 种中药复方对小鼠的免疫增强作用

管远红¹, 张家禾², 秦 枫¹, 周广生¹, 左伟勇¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西南昌 330045)

摘要:通过 4 种中药复方对小鼠的脾脏指数、体重、腹腔巨噬细胞吞噬指数和吞噬率、溶血素、溶血空斑、淋巴细胞增殖、血清中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、自然杀伤细胞(NK 细胞)的影响作用,测得不同中药复方与对照组的差异。结果表明,复方 1 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、血液中溶血素水平差异显著,复方 2 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率、血液中溶血素和溶血空斑差异显著;复方 3 对小鼠吞噬指数、血液中溶血素和溶血空斑、淋巴细胞增殖(ConA)差异显著;复方 4 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、血液中溶血素和溶血空斑、淋巴细胞增殖(LPS)、血液中 NO 和 NK 细胞均差异显著。不同中药复方中复方 4 的免疫增强作用最强。

关键词:中药复方;免疫增强;淋巴细胞增殖;溶血素

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0224-03

众所周知,在治疗多数疾病中,西药作为常选药物在治疗重症、急症、疼痛性疾病中发挥了不可替代的作用。但与中药相比,西药也表现出许多不足,新药物的开发难度增加,对机体的刺激作用和伤害也不容忽视,在治疗细菌性疾病时容易产生细菌耐药性,在杀灭有害菌的同时对机体的有益菌也造成了不同程度的伤害,在治疗病毒性疾病时表现力有所不足,尤其对新出现的病毒性疾病常常会在一段时间内出现无治疗药物时期,比如 SARS、H1N1、H7N9 等疾病,在初发现时总是无特定的药物治疗,只有在一段时间后才西药的研发产品,这时人们往往想到的是中药,如对板蓝根的抢购。与西药相比,中药复方被广泛用于病毒性传染病的预防和治疗^[1]。中国传统中药复方在数千年发展过程中,在保障人体和动物机体健康的过程中发挥了不可替代的作用,但新药复方的研发相对比较缓慢。中药复方除了有能够治疗慢性疾病、毒副作用小等优点外,近年来相关学者提出中药思维模式的研究,Lu 等指出中药模式可能导致革新^[2]。本试验根据中药复方的组方原则,选取多味中药,制成 4 种复方制剂,研究各中药复方的免疫增强作用。

收稿日期:2013-11-26

基金项目:江苏农牧科技职业学院科技攻关(编号:YB201103)。

作者简介:管远红(1978—),男,江西玉山人,硕士,讲师,主要从事兽

医药理教学及相关研究。E-mail:gyh235@163.com。

通信作者:左伟勇,博士,副教授。E-mail:jsmyjwc@126.com。

[3] 杨玉琴,杨晓野,杨莲茹,等. 少孢节丛孢菌的生长特性研究[J]. 中国兽医科技,1998,28(10):24-25.

[4] 杨莲茹,杨晓野,杨玉琴,等. 捕食线虫真菌的分离鉴定[J]. 中国农业大学学报,1998,7(S2):76-78.

[5] 秦泽荣,缪作清,李美子,等. 新鲜牛粪便中食线虫真菌的分离和鉴定[J]. 中国兽医学报,2001,21(1):58-59.

[6] 杨晓野,汪 明,杨莲茹,等. 寄生虫生物控制概述[J]. 中国兽医杂志,2003,39(7):30-32.

[7] Grønvald J, Wolstrup J, Nansen P, et al. Nematode-trapping fungi

1 材料与方法

1.1 试验药物

蒲公英、山银花、淡竹叶、山楂、连翘、党参、生姜、红芪、三七、甘草、桔梗、黄连、栀子、丹皮、黄芪、赤芍、玄参、知母、石膏、水牛角、生地、金银花、野菊花、紫花地丁、紫背天葵、黄芩、黄药子、白药子、大黄、浙贝母、防风、蝉蜕、郁金、朴硝、喜炎平、木蓝,试验药物均购自江苏泰州市同仁堂药店。

1.2 试剂与仪器

刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)、瑞氏染液、细胞培养板、小鼠淋巴细胞分离液、RPMI 1640 液体培养基、青链霉素混合液、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、苯酚红、酶标条、水解乳蛋白、细胞计数板、无菌脱纤维羊血等购自江苏扬州科能生物科技有限公司;一氧化氮(NO)试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)分型试剂盒购于南京建成生物工程研究所;自然杀伤细胞(NK 细胞)酶免疫分析试剂盒购自上海桥杜商贸有限公司。U-2901 型紫外、可见及近红外分光光度计(日本 HITACHI 公司生产)、ELX800 型酶标仪(美国 Biotek 公司生产)、NU-4750E 型 CO₂ 培养箱(美国 Nuair 公司生产)、RE-3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂生产)、DW-20K 调温电热器(上海苏达实验仪器有限公司生产)。

1.3 试验动物

4~6 周龄 ICR 小鼠,雌性各 50%,购于扬州大学试验动物中心。

against parasitic cattle nematodes[J]. Parasitology Today,1993,9(4):137-140.

[8] Waller P J, Larsen M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock[J]. International Journal for Parasitology,1993,23(4):539-546.

[9] Cooke R C, Godfrey B. A key to the nematode-destroying fungi[J]. Transactions of the British Mycological Society,1964,47(1):61-74.

[10] 李天飞,张克勤,刘杏忠. 食线虫菌物分类学[M]. 北京:中国科学技术出版社,2000.