پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۷۱، تابستان ۱۳۸۵

مطالعه اثرات نماتود کشی قارچ *Arthrobotrys robusta* بر روی نوزاد نماتودهای ریوی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی

• **محمد یخچالی**، گروه پاتوبیولوژی ، بخش انگل شناسی ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه پردیس نازلو
• **عبدالغفار اونق**، گروه پاتوبیولوژی ، بخش میکروبیولوژی ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه ، ارومیه-ایران
• **علیرضا خسروی**، گروه قارچ شناسی ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، تهران- ایران.

تاریخ دریافت:آبان ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

E-mail: yakhchalim@yahoo.com

چکیده

دراین مطالعه، ابتدا مدفوع گوسفند در محیط پوتیتو دکستروز آگار و سابوروگلوگز آگار واجد کلرامفنیکل ؛ کشت خطی داده شد. سپس پرگنه قارچهای نماتود خوار به محیط کورن میل آگار تلقیح می‌شدند و همزمان نوزاد کرم ریوی *Dictiocollus fillaria* نیز به روش برمن جمع آوری می‌شدند. پرگنه قارچ نماتودکش *Arthrobotrys robusta* (به ابعاد ۱ × ۱ سانتی متر) به تفکیک به ۱۰ عدد پتری دیش اضافه گردید و در هر پتری دیش نیز به تفکیک ۵۰۰ عدد نوزاد زنده و فعال کرم ریوی *D. fillaria* در ۴۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ اضافه شدند (گروه تیمار) و به ۱۰ پتری دیش دیگر نیز که فقط حاوی کورن میل آگار بودند , به تفکیک ۵۰۰ عدد نوزاد زنده و فعال کرم ریوی در ۴۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ اضافه شدند (گروه شاهد). مقایسه نتایج در دو گروه تیمار و شاهد نشان داد که قارچ *A. robusta* به میزان ۳۲/۳٪ از تعداد نوزاد کرم‌های ریوی در مقایسه با گروه شاهد کاسته شده است (p<۰/ ۰۰۱).

کلمات کلیدی : نماتود خوار، *Arthrobotrys robusta* ، نماتود ریوی ، گوسفند

Pajouhesh & Sazandegi No:71 pp: 43-47

***In vitro* assessment of nematocidal ability of *Arthrobotrys robusta* on lungworm larvae in sheep.**

By: Yakhchali, M. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia – Iran.; Onagh, A.Gh.Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia – Iran.; Khosravi, A.R.Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran – Iran.

Plates (3.5 cm diameter) containing corn meal agar (CMA) were divided in two groups (treatment and control). Plate's in-group A was seeded with a 1cm ×1 cm thick plug from a culture of *A. robusta*. The ages of the *A. robusta* culture at the time of the transfer was 7. Plates in group B contained just CMA, without fungus, and plates were used to show the

movement of the larvae on the plates. Then 40 microliter of an aqueous suspension, containing approximately 500 larvae, were deposited on each of plates and the plates were incubated at 25 °C for 14 days. In this *in vitro* trial, the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* against lungworm larvae on CMA plates was evaluated. Results indicated that *A. robusta* in comparing with control group could decrease number of lungworm larvae (33.95%) significantly ($p<0.001$).

Keywords: Nematocidal, *Arthrobotrys robusta*, Lungworm, Larvae, Sheep

مقدمه

بیش از یک قرن است که قارچ‌های نماتودخوار گزارش شده‌اند و بالغ بر ۱۵۰ گونه آنها شناسایی گردیده‌اند (۸) و متعلق به کیتریدیومایکوتا و اوومایکوتا هستند (۱۲،۶) . این گروه از قارچها دارای قابلیت صید و تخریب نماتودها در محیط خاک می‌باشند و به این دلیل به عنوان عوامل مطرح در تحقیقات مرتبط با کنترل زیست شناختی نماتودهای انگل گیاهی و دامی‌مورد توجه قرار گرفته اند (۸). این قارچ ها به وفور در خاک یافت می‌شوند و به طور معمول در محیط غنی از مواد آلی زندگی می‌کنند (۱۳) . جنس های شکارچی هایفومیست‌ها از جمله گونه های جنس آرتروبوتریس در طی دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ در سطح وسیعی از نظر رفتار صیادی بر ضد نماتودهای انگل حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۴) و هنوز نیز تحت بررسی و مطالعه می‌باشند (۱۱). بر این اساس هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی قارچ نماتودخوار *A. robusta* و مطالعه اثر نماتودخواری آن بر روی نوزاد نماتودهای ریوی انگل گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود .

مواد و روش کار

پس از نمونه‌گیری از مدفوع گوسفند ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۸ نرمال به آن اضافه شد . سپس با افزودن آنتی بیوتیک (پنیسیلین جی (۸۰۰ واحد بین‌المللی) و استرپتومایسین (۱ گرم) در محیط پوتیتو دکستروز آگار و سابوروگلوگز آگار واجد کلرامفنیکل کشت خطی تهیه شد و نمونه‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. قارچ های نماتودخوار رشد کندی داشتند (در هفته‌های سوم و چهارم پرگنه‌های مشخصی تولید نمودند) و از این کلنی‌ها اسلاید کالچر تهیه گردید تا بررسی میکروسکوپی شوند (تصویر ۱)(۲). برای جداسازی قطعی قارچ نماتودخوار پرگنه‌های مورد نظر به داخل محیط کشت کورن میل آگار تلقیح می‌شدند . پس از انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ هفته مجدداً در محیط کشت کورن میل آگار پاساژ داده می‌شد و بعد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۴ روز نگهداری می‌گردید (۴،۳). تشخیص اولیه قارچ جدا شده بر اساس کلید تشخیص میناسیان و علی‌زاده (۶) مبتنی برخصوصیات ظاهری پرگنه و اسلاید کالچر (مشاهدات ریزبینی و میکرومتری کونیدی و ساختار میسلیومی) انجام می‌شد. تایید نهایی قارچ نیز توسط گروه قارچ شناسی دانشگاه تهران صورت گرفت.

نوزاد کرم‌های ریوی پس از جمع آوری نمونه مدفوع گوسفندان آلوده به انگل‌های کرمی ریه در آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه ارومیه به روش برمن جمع‌آوری می‌شدند و بر اساس خصوصیات ریزبنی و کلید تشخیص نوزاد کرم های ریوی تعیین گونه می‌گردیدند (۱). نوزادهای *D.fillaria* با گذرانیدن از صافی در محلول آنتی بیوتیک دار (پنی سیلین ۲۰۰ واحد بین المللی + استرپتومایسین ۲۶۰ میلی گرم در میلی لیتر) شستشو داده می‌شدند و در آب استریل برای پاک کردن باقیمانده‌های آنتی بیوتیکی مجددا شسته می‌شدند .

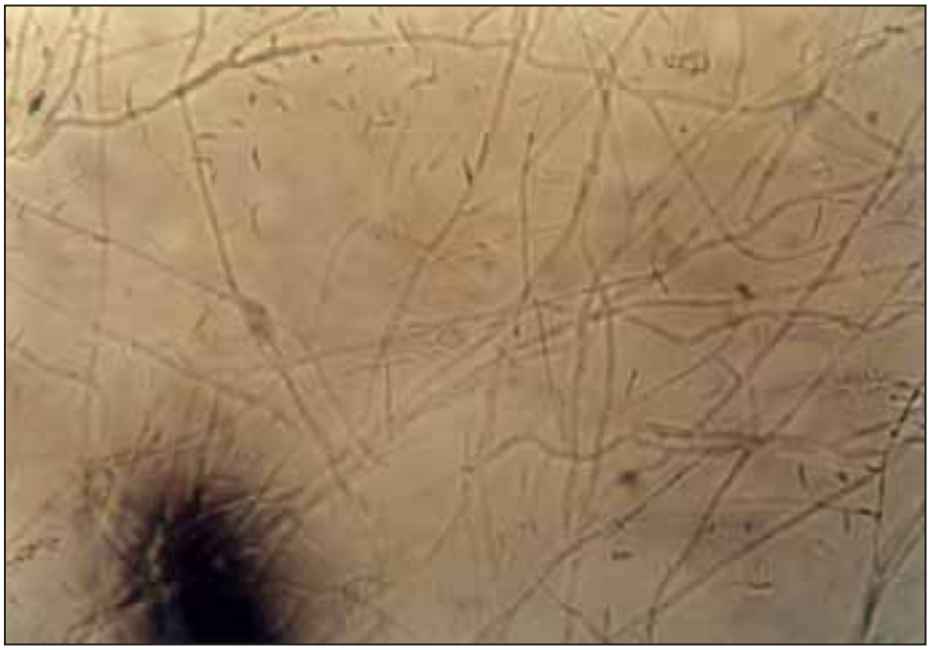
پرگنه قارچ نماتودکش *A. robusta* (به ابعاد ۱ × ۱ سانتی متر) به تفکیک به ۱۰ عدد پتری دیش اضافه گردید و در هر پتریدیش نیز به تفکیک گونه کرم ، ۵۰۰ عدد نوزاد زنده در ۴۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ اضافه شدند (گروه تیمار) . به ۱۰ پتری دیش دیگر نیز که فقط حاوی کورن میل آگار بودند , ۵۰۰ عدد نوزاد زنده در ۴۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ اضافه شدند (گروه شاهد). گروه‌های تیمار و شاهد در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند . پس از این دوره زمانی, پتری دیش‌های هر دو گروه تیمار و شاهد به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی های مختلف (۱۰ × و ۴۰ ×) بررسی می‌شدند. برای شمارش نوزادهای زنده و به تله افتاده با سطح پتری دیش ها با سرم فیزیولوژی شسته می‌شدند و نوزادهای زنده که از شستشوی پتری دیش جمع‌آوری می‌شدند شمارش می‌گردیدند. با احتساب تفاضل تعداد نوزادهای زنده از کل نوزادها در هر پتری دیش میزان کاهش در تعداد نوزادهای شمارش شده نسبت به قبل از مجاورت آنها با قارچ *A. robusta* مشخص و درصد نوزادهای به تله افتاده تعیین می‌شد (۱۱،۷،۵).

نتایج

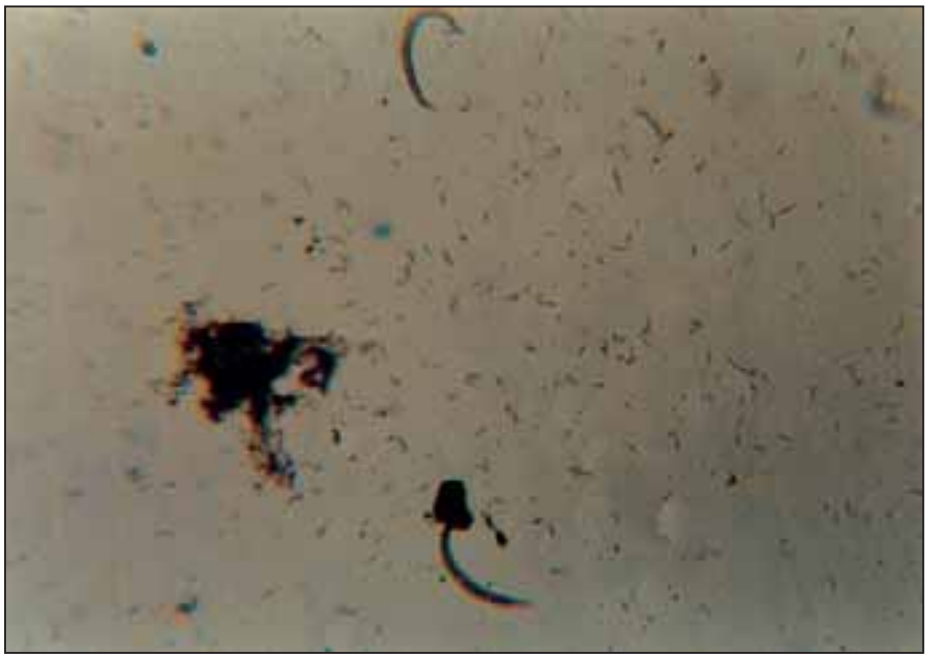
نتایج مطالعه اثر نماتود کشی قارچ *A. robusta* نشان داد که از تعداد نوزاد کرم ریوی *D.fillaria* در مقایسه با گروه شاهد پس از گذشت ۱۴ روز کاسته شده است (تصویر ۲) (جدول ۱). زیرا در آزمون آماری قابلیت تله گذاری قارچ یک توزیع دو جمله‌ای فرض شد و آزمون F نشان داد که قارچ *A. robusta* به میزان ۳۲/۳٪ از تعداد نوزاد کرم ریوی *D.fillaria* در مقایسه با گروه شاهد کاسته شده است ($p <$ ۰/ ۰۰۱).

بحث

نقش صیادی قارچهای نماتود خوار هایفومیست بر ضد تعدادی از



تصویر شماره ۱ - اسلاید کالچر قارچ *A. robusta* جدا شده از مدفوع گوسفند (بزرگنمایی ۱۰۰×)



تصویر شماره ۲ - نوزاد *D.fillaria* تلف شده پس از مجاورت با قارچ *A. robusta* در شرایط آزمایشگاهی (بزرگنمایی ۴۰×)

جدول شماره ۱ - نتایج نسبت درصد به دام افتادن نوزاد کرم ریوی *D.fillaria* توسط قارچ *A. robusta* پس از ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شرایط آزمایشگاهی)

میزان تله گذاری (٪)	تعداد نوزاد زنده (پس از مجاورت با قارچ)		تکرارها
	گروه شاهد	گروه تیمار	
۹۲/۵	۲۰۰	۱۸۵	۱
۱۵/۸	۱۷۴	۳۱	۲
۳۱/۳	۵۱	۱۷	۳
۲۸/۳	۵۶	۱۷	۴
۲۳	۹۲	۲۳	۵
۲۸/۱	۷۹	۲۴	۶
۱۸/۲	۷۰	۱۴	۷
۳۰/۱	۱۳۶	۴۴	۸
۴۴/۹	۱۳۹	۶۵	۹
۲۹/۳	۵۷۲	۵۴	۱۰
۳۲/۳	۱۰۰۹	۳۲۶	جمع کل

نماتودهای انگلی نشخوار کنندگان در شرایط آزمایشگاهی توسط تعداد زیادی از محققین در سال‌های گذشته بررسی شده است (۱۱) . در ایران نیز این مطالعه از نخستین مطالعات در زمینه اثرات نماتود کشی قارچ نماتودکش *A. robusta* می‌باشد .

مفید بودن استفاده از عوامل کنترل زیست شناختی، مستلزم در نظر گرفتن محدوده خاصی از شرایط محیطی است تا نقش صیادی این عوامل قابل بررسی باشد. به‌طور معمول، بهره‌گیری از عوامل زیست شناختی، نیازمند ارزیابی عواملی است که بر عملکرد مفید آنها اثرگذار است. مطالعاتی که Morgan و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی مرحله ساپروفیتی قارچ *A.oligospora* به عنوان یکی از ساپروفیت‌های رده هایفومیست‌ها انجام دادند ، نشان داد که این قارچ صیاد به عنوان یک قارچ گنده روی احتیاجات غذایی ساده دارد به طوری که توانایی آن در صید نوزاد نماتود به عنوان یک منبع جایگزین غذایی، هیچ نفع دیگری ندارد(۱۵). در مورد نحوه هم کنش قارچ با نوزاد زنده باید گفت که کوتیکول نماتودهای مختلف یکسری واکنش‌های بیولوژیکی با قارچ های نماتود خواردارند . هم کنش بین نماتود و قارچ صیاد نماتود واکنش پیچیده ای است که شامل هم کنش پلیمرهای سطحی، فعالیت‌های آنزیمی و سیستم باند شونده لکتین کربوهیدرات بین تله‌های قارچی و نماتود است (۱۶) . در بررسی‌های اخیر مشخص گردیده است تفاوت‌هایی که در ویژگی صیادی قارچ‌های نماتودکش دیده می‌شود بدلیل اختلافات آنتی ژنتیکی پوشش خارجی نوزادها می‌باشد (۱۴). به عنوان مثال نوزاد عفونی *Strongyloides papillosus* به دلیل دارا نبودن صفحه خارجی که در نوزاد *Haemonchus contortus* دیده می‌شود ، شاخص‌های آنتی ژنتیکی متفاوتی دارند (۱۷).

البته در در این مطالعه قارچ نماتود خوار *A. robusta* توانست موجب کاهش در تعداد نوزاد کرم‌های ریوی به میزان ۳۳/۹۵٪ گردد ($p<0/001$) و Vazquez-Prats و Mendoza(۱۹) در مطالعه اثرات نماتودکشی قارچ *A. robusta* بر روی نوزاد عفونت‌زای *H. contortus* نشان دادند که این قارچ توانسته است به میزان ۱۰/۱٪ از تعداد نوزادها بکاهد . گرچه در مطالعه Gonzalez و همکاران (۱۱) نوزاد نماتود *St. papillosus* قادر گردیده است به سادگی از تله‌های چسبنده *A. robusta* فرار کند و گرفتار نشود . Dias و همکاران (۹) نیز در مطالعه‌ای که بر روی قارچ‌های نماتود خوار جدا شده از نمونه‌های خاک در برزیل نشان داده‌اند که قارچ *A. robusta* با ایجاد تله‌های از نوع شبکه‌های چسبنده و به روش مکانیکی قادر به شکار نوزاد نماتودها می‌باشد. در مطالعه دیگری , Gomes و همکاران (۱۰) نشان داده‌اند که از ایزولیت‌های *A. robusta* فقط سه ایزولیت گونه‌های مناسبی برای کنترل زیست شناختی نوزادهای *Cooperia punctata* می‌باشند. البته Santos (۱۹) در مطالعه‌ای نشان داد که در بروز قابلیت صیادی بین ایزولیت‌های مختلف و گونه منفردی از *A. robusta* بر روی نوزادهای عفونت‌زای *H. placei* اختلاف معنی‌داری وجود دارد .

منابع مورد استفاده

۱ - اسلامی، ع. ۱۳۷۶؛ کرم‌شناسی دامپزشکی(نماتود و آکانتوسفالا) . انتشارات دانشگاه تهران ، جلد سوم ، صفحات ۴۶۹-۴۶۴ .

۲ - اسکندری، ف. ۱۳۶۵؛ تشخیص آزمایشگاهی قارچهای مهم پزشکی . انتشارات دانش پژوه ، صفحات ۱۹۳-۱۸۵ و ۱۶۲-۱۶۱.

۳ - خسروی , ع. ۱۳۷۰؛ قارچ شناسی پزشکی (روش‌های عملی). انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران , صفحات ۴۹-۵ و ۹۳-۸۳ .

۴ - شادزی ، ش. ۱۳۶۳؛ قارچشناسی پزشکی. انتشارات نشاط ، اصفهان ، صفحات ۳۰۶-۲۹۵.

۵ - مهرآوران ، ح. ۱۳۷۲؛ مبانی قارچها . انتشارات دانشگاه تهران ، چاپ اول، صفحات ۳۴۳-۳۴۱.

۶ - میناسیان ، و. ؛ علیزاده ، ع. ۱۳۶۸؛ قارچهای ناقص (جنس‌های مشهور و مصور). انتشارات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز ، چاپ اول .

۷ - کوئین، پ.ج. ۱۹۹۲؛ قارچشناسی و بیماری‌های قارچی در دامپزشکی (ترجمه اردشیر سالمی) . انتشارات مرکز نشر سپهر، نیکخواه ، صفحات ۷۲-۶۵.

8- Barron, G.L., 1977; The nematode destroying fungi. Canadian biological publications Ltd., Guelf, Ontario, Canada, 21.

9- Dias,W.P.; Ferraz,S.; Muchovej, J.J., 1995; Detection, isolation and identification of nematode predaceous fungi in soil samples from different regions of Brazil. Revista-Ceres. 42: 244, 615-620.

10- Gomes, A.P.S.; Vasconcellos, R. S.; Ramos, M. P.; Guemaraes, M.P.; Yatsuda, A.P.; Vieira, M.C.R., 2001; *In vitro* interaction of Brazilian strains of the nematode-trapping fungi Arthrobotrys spp. on Pangrellus sp. and *Cooperia punctata*. Mem inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96(6): 861-864.

11- Gonzalez, C.M.E.; Mendoza De Givez, P.; Quiroz Romero, H., 1998; Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys oligospora* and *Monacrosporium gephyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. Journal of Helminthology,

72(3): 209-213.

12- Janson, H. B.; Jeyaparakash, A.; Zucherman, M., 1985; Differential adhension and infection of nematodes by the endoparasitic fungus *Meria coniospora* (Deutromycetes). Applied and Environment Microbiology, 552-555.

13-Levine, N. D., 1963; Weather, climate and the bionomics of ruminant nematode larvae. Advanced Veterinary Science: 8, 215.

14- Mendoza, D. P.; Zavaleta, E.; Quiroz, H.; Herrra , D.; Perdomo, F., 1992; Interaction between the nematode destroying fungus A . robusta and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. Veterinary Parasitology ,41 (8)101 – 107.

15- Morgan, M.; Behnke, J.M.; Lucas, J.A.; Peberdy, J.F., 1997; In vitro assessment of the influence of nutrition , temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys olgospora* , *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum* . Parasitology , 115 (2) : 303 – 310 .

16- Nordbring, H. B., 1979; Action of a nematode trapping fungus shows lectin - mediated host microorganism interaction. Nature, 281(3): 123 –125.

17- Raman, M.; Anandan, R.; Josef, S.A., 1996; Differentiation of various infective larvae of Strongylus of dairy animals. Journal of Veterinary Parasitology, 20(3): 171- 174.

18- Santos, M.A ; Araujo, J.V.; Ferraz, S.; Maia, A.S., 1993; Antagonistic effect of predacious Arthrobotrys fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. Journal-of-Helminthology.67: 2, 136-138.

19- Vazquez-Prats, V.M.; Mendoza-De-Gives, P., 1994; Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. Veterinary Parasitology. 55: 3, 197-203