کنترل زیستی همونکوس کونتورتوس توسط قارچهای نماتودخوار آرتروبوتریس اولیگوسپورا، دادینگتونیا فلگرنس و هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم

دکتر شاهرخ رنجبر بهادری[1*] دکتر علی اسلامی[2] دکتر مهدی رزاقی ابیانه[3] دکتر رسول زارع[4]

دریافت مقاله :۲۳فروردین ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی :۲۶ اسفند ماه ۱۳۸۲

هدف: کنترل زیستی نماتودهای دستگاه گوارش نشخوارکنندگان.

طرح: آزمون مقایسه عملکرد .

نمونه ها: پنجاه نمونه مدفوع گوسفند آلوده به تخم هموئکوس کونتورتوس.

روش: نمونه لیوفیلیزه دو جدایه از قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا 111.37 و 251.82 و یک جدایه از قارچ دادینگتونیا فلگرنس 583.91 و همچنین یک جدایه از قارچ هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم 381.84 تهیه و سپس ۸۰۰۰ ، ۲۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از هریک از جدایه‌های فوق (۴۵ نمونه) به یک گرم مدفوع حاوی ۷۰ عدد تخم هموئکوس کونتورتوس مدفوع افزوده شد و کلیه نمونه‌ها به مدت ۸ روز در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند (برای ایجاد نوزاد مرحله سوم) و پس از جداسازی نوزادهای تولید شده به روش برمن، اثر نماتودخواری این جدایه‌ها در مقایسه با گروه شاهد مقایسه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تست One-Way ANOVA و روش تکمیلی توکی .

نتایج: با افزودن ۸۰۰۰ کنیدی از قارچهای فوق و ۲۰۰۰۰ کنیدی از قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا جدایه 251.81 در مقایسه با شاهد کاهش محسوسی در تعداد نوزادان مرحله سوم هموئکوس کونتورتوس به وجود نیامد ولی در مورد آرتروبوتریس اولیگوسپورا جدایه 111.37 و دادینگتونیا فلگرنس جدایه 581.9 در ازای افزودن تعداد ۲۰۰۰۰ کنیدی، کاهش به شدت معنی داری در مقایسه با شاهد مشاهده گردید. با افزودن ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از هرسه جدایه مورد آزمایش کاهش به شدت معنی داری در تعداد نوزادان به وجود آمد. در مورد قارچ هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم با افزودن ۸۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ کنیدی به ترتیب باعث ۲۱/۴۶ و ۴۸/۹۹ درصد کاهش در تعداد نوزادها گردید اما با افزایش تعداد کنیدی به ۱۰۰۰۰۰ تنها ۴۲/۲۸ درصد کاهش در تعداد نوزادان عفونتزا مشاهده گردید.

نتیجه گیری: بررسی اخیر نشان داد که با استفاده از جدایه های قارچهای آرتروبوتریس اولیگوسپورا و دادینگتونیا فلگرنس می توان در صورت ایجاد شرایط لازم به صورت توأم با درمان شیمیایی به خوبی نماتودهای دستگاه گوارش نشخوارکنندگان را کنترل نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، (۱۳۸۳) ،دوره ۵۹، شماره ۴ ، ۳۱۲-۳۰۹.

واژه‌های کلیدی: قارچهای نماتودخوار، آرتروبوتریس اولیگوسپورا ، دادینگتونیا فلگرنس، هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم، هموئکوس کونتورتوس.

۱)گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد گرمسار، گرمسار-ایران .
۲) گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران .
۳)بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران - ایران .
۴) موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران - ایران .
*)نویسنده مسؤول bahadory_2000@yahoo.com

Biological Control of *Haemonchus contortus* by Nematophagous Fungi: *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Haptocillium sphaerosporum*

Bahadori Sh. R.,[1] Eslami A.,[2] Razzaghi abyaneh M.[3], Zare R.[4]
[1]Faculty of Veterinary Medicine,Garmsar branch Azad University ,Garmsar - Iran.[2] Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran , Tehran - Iran.[3]Department of Mycology , Pasteur Institute of Iran ,Tehran - Iran .[4] Botany Research Institute of Agriculture Ministry . University of Tehran , Tehran - Iran .

Objective: Biological control of gastrointestinal nematodes of ruminants .

Design: Case-control study .

Samples: A total of 50 sheep feces naturally infected by *Haemonchus contortus ova* .

Procedure: *Arthrobotrys oligospora* (111.37 & 251.83), *Daddingtonia flagrans* (583.91) and *Haptocillium sphaerosporum* (381.84) were obtained and the nematophagous activity of these isolates was studied after addition of 8000, 20000 and 100000 conidia to 1 gram of fecal samples containing 70 ova of *Haemonchus contortus* per each petridish. All of the samples were incubated at 25-27°C for 8 days and then, the nematophagous effect of fungal isolates were determined after calculation of third staged larval reduction using Berman method .

Statistical analysis: One-way ANOVA and complementary method of Tukey were used.

Results: Study of nematophagous effects of 8000 conidia of all above-mentioned fungi and 20000 conidia of *A. oligospora* (251.82) on the third stage larvae of *H. contortus* showed that there was not any significant difference as compared with the control groups. But for 20000 conidia of *A. oligospora* (111.37) and *D. flagrans* (583.91) and also 100000 conidia for all above-mentioned fungi, significant reduction in larvae of *H. contortus* was observed as compared with the control groups. In *H. sphaerosporum*, the percentage of larvae reduction for 8000 and 20000 conidia was determined as 21.46% and 48.99%, respectively. But, the increasion of conidia to 100.000 caused only 42.28% reduction in infective larvae so above-mentioned fungus can not function as an effective agent in biological control of *H. contortus*.

Clinical implications: The present study showed that we can control gastrointestinal nematodes by use of nematode-trapping fungi, in suitable conditions along with chemical treatment. ***J.Fac. Vet. Med.Univ.Tehran.59,4:309-312,2004.***

Key words: Nematophagous fungi-*Arthrobotrys oligospora*-*Daddingtonia flagrans*-*Haptocillium sphaerosporum*-*Haemonchus contortus*.

Corresponding author's email:bahadory_2000@yahoo.com

در حال حاضر یکی از مشکلات کنترل نماتودهای انگلی نشخوارکنندگان و تک سمیها، مقاومت آنها در برابر داروهای ضد کرمی است. علاوه بر آن بقایای دارو در تولیدات دام از جمله شیر و گوشت و خطرات بهداشتی آن برای انسان و صرف هزینه های ریالی و ارزی برای واردات دارو و یا مواد اولیه دارو، کنترل زیستی را دارای جایگاهی خاص و ممتاز نموده است و قارچها دسته ای از موجودات حائز اهمیت در این رابطه می باشند که وفور آنها در طبیعت، آسان بودن جمع آوری و تکثیر آنها، توانایی عبور از لوله گوارش بدون آسیب رساندن به دام از ویژگیهای آنهاست (۱۲).

نخستین گزارش یک قارچ شکارچی توسط Lodhe در سال ۱۸۷۴ و در مورد قارچ هار پوسپوریوم انگوئیلوله بود و این قارچ از مناطق مختلفی جدا گردیده است (۹). Fresenius در سال ۱۸۵۰ برای اولین بار قارچ نماتودخوار آرتروبوتریس اولیگوسپورا را از راسته *هایفومیست ها* معرفی نمود. البته Woronin در سال ۱۸۷۰ دریافت که قارچ نماتودخوار آرتروبوتریس اولیگوسپورا شبکه‌های حلقوی تولید می نماید و Zopf در سال ۱۸۸۸ به توانایی آن در به دام انداختن نوزاد نماتودها پی برد (۹). Shepherd در سال ۱۹۶۱ آرتروبوتریس اولیگوسپورا را عمده ترین قارچ خاکهای مزارع دانمارک گزارش نمود (۱۰). Faedo و Waller در سال ۱۹۹۶ در یک بررسی ۹۴ گونه قارچ با فعالیت شناخته شده نماتودخواری را از نظر توانایی آنها برای کاهش تعداد نوزادان عفونتزای نماتود در گوسفند و نیز از نظر توانایی آنها برای حمله به نماتودها و تولید مواد کشنده در محیط کشت مدفوع مورد آزمایش قرار دادند (۱۱).

مواد و روش کار

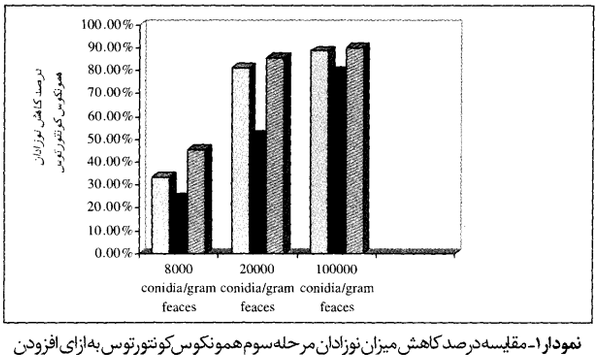
دو جدایه از قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا (CBS 111.37=IRAN 431C و CBS 251.82 = IRAN 432C) و یک جدایه از قارچ دادینگتونیا فلگرنس (CBS 583.91 = IRAN 433C) و یک جدایه از قارچ هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم (CBS 381.84 = IRAN 510C) از مرکز قارچ شناسی هلند Central Bureau Voor Schimmelcultures (CBS) و موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی بصورت لیوفیلیزه تهیه شد. پس از آن قارچها روی محیط کشت PDA انتقال داده شدند و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا علاوه بر رشد کامل، کنیدی زایی نیز انجام پذیرد و سپس با شستشوی سطح هر ظرف کشت اقدام به جمع آوری و شمارش کنیدی تولید شده به کمک لام گلبول شمار گردید. پس از آن با افزودن ۸۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از قارچهای مورد آزمایش به یک گرم از مدفوع گوسفند آلوده به ۷۰ عدد تخم همونکوس کونتورتوس و کشت آن به مدت ۸ روز در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد نوزادهای مرحله سوم همونکوس کونتورتوس به روش برمن جدا گردید و با استفاده از روشهای آماری اثر نماتودخواری قارچهای مورد آزمایش روی نوزادهای عفونتزای فوق مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

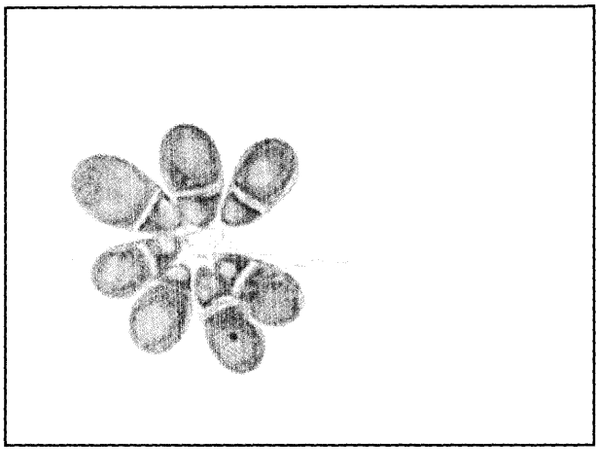
۱- **تهیه جدایه‌های قارچ**: پس از تهیه جدایه های قارچ از موسسات ذکر شده، با کشت آنها روی لام و رنگ آمیزی با لاکتوفنل- کاتن بلو، ساختمان زایشی کنیدیوفورها از قبیل کنیدی و نحوه آرایش آنها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- **بررسی تاثیر قارچهای مورد آزمایش روی نوزادان مرحله سوم همونکوس کونتورتوس**: با افزودن ۸۰۰۰ کنیدی از همه جدایه های مورد آزمایش و همچنین ۲۰۰۰۰ کنیدی از جدایه آرتروبوتریس اولیگوسپورا 251.83 اختلاف معنی داری در مقایسه با کشت شاهد مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) ولی افزودن ۲۰۰۰۰ کنیدی از جدایه های آرتروبوتریس اولیگوسپورا 111.37 و دادینگتونیا فلگرنس 581.9 (P<۰/۰۱) و همچنین ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از هر سه جدایه فوق کاهش به شدت معنی داری در مقایسه با شاهد در تعداد نوزادان مرحله سوم همونکوس کونتورتوس مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱). مقایسه اثر نماتودخواری سه قارچ با یکدیگر نشان داد که با افزودن ۸۰۰۰ کنیدی (P=۰/۴۹۲۲)، ۲۰۰۰۰ کنیدی (P=۰/۲۵۹۲) و ۱۰۰۰۰۰ کنیدی (P>۰/۰۵) از هر جدایه به مدفوع حاوی تخم همونکوس کونتورتوس اختلاف معنی داری بین جدایه ها وجود ندارد. در ضمن مقایسه اثر نماتودخواری تعداد مختلف از کنیدی های قارچی نیز نشان داد که در مورد جدایه های 111.37 و 251.82 افزودن تعداد ۸۰۰۰ کنیدی در مقایسه با ۲۰۰۰۰ کنیدی و نیز ۲۰۰۰۰ کنیدیوم در مقایسه با ۱۰۰۰۰۰ کنیدی اختلاف معنی داری در کاهش تعداد نوزاد همونکوس کونتورتوس نداشته در حالی که در مورد افزودن ۸۰۰۰ کنیدیوم در مقایسه با ۱۰۰۰۰۰ کنیدیوم اختلاف معنی دار می باشد (P<۰/۰۱). در مورد جدایه دادینگتونیا فلگرنس نیز اختلاف بین افزودن ۸۰۰۰ کنیدی با ۲۰۰۰۰ کنیدی و همچنین ۸۰۰۰ کنیدی با ۱۰۰۰۰۰ کنیدی باعث کاهش معنی دار در تعداد نوزادان میگردد (P<۰/۰۱) ولی اختلاف بین افزودن ۲۰۰۰۰ کنیدی در مقایسه با ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از جدایه فوق معنی دار نمی باشد (نمودار ۱).

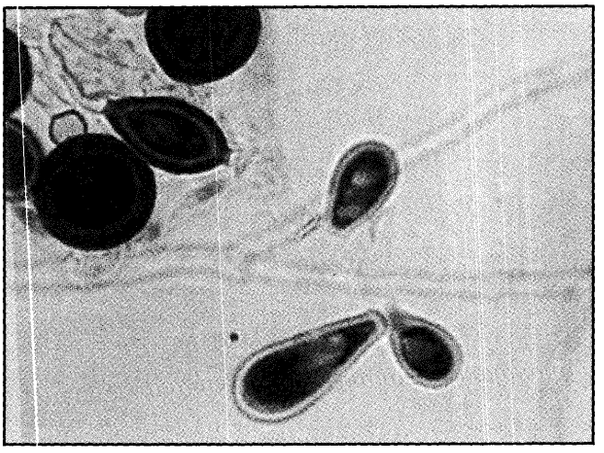
در مورد قارچ هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم 381.84 ، کاهش تعداد نوزادان همونکوس کونتورتوس در اثر افزودن ۸۰۰۰ کنیدی از قارچ در مقایسه با شاهد معنی دار نمی باشد ولی این کاهش در اثر افزودن ۲۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از قارچ فوق کاملاً معنی دار می باشد (P<۰/۰۱). البته مقایسه اثر نماتودخواری قارچ در اثر افزودن ۸۰۰۰ کنیدی در مقایسه با ۲۰۰۰۰ کنیدی محسوس می باشد (P<۰/۰۵) ولی این اثر با افزودن ۸۰۰۰ کنیدی در مقایسه با ۱۰۰۰۰۰ کنیدی و نیز ۲۰۰۰۰ کنیدی در مقایسه با ۱۰۰۰۰۰ کنیدی معنی دار نمی باشد و با افزودن ۸۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ کنیدی به ترتیب ۲۱/۴۶ و ۴۸/۹۹ درصد از



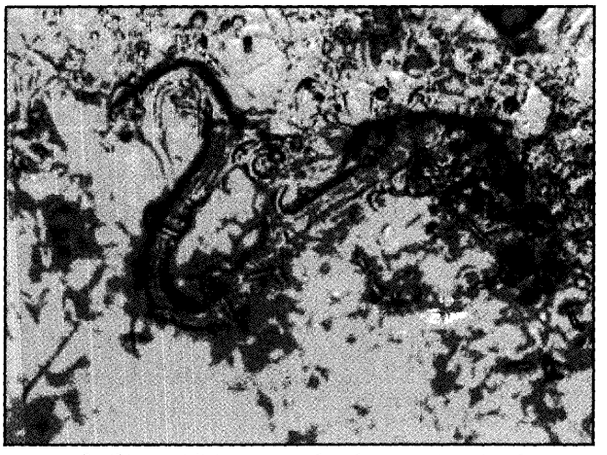
نمودار ۱- مقایسه درصد کاهش میزان نوزادان مرحله سوم همونکوس کونتورتوس به ازای افزودن مقادیر مختلف از کنیدی های قارچهای آرتروبوتریس اولیگوسپورا و دادینگتونیا فلگرنس.



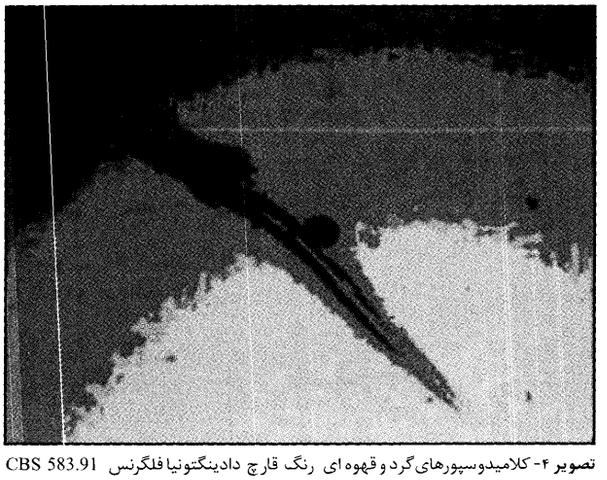
تصویر ۱- کنیدیومهای تخم مرغی شکل قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا CBS 251.83 (دسی شیئی ۴۰).



تصویر ۲- کنیدیومهای بیضی شکل و کلامیدوسپورهای گرد با دیواره ضخیم قارچ دادینگتونیا فلگرنس CBS 583.91 (دسی شیئی ۴۰).



تصویر ۳- یک نوزاد مرحله سوم هموتکوس کونتورتوس به دام افتاده توسط قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا CBS 111.37 (دسی شیئی ۱۰).



تصویر ۴- کلامیدوسپورهای گرد و قهوه ای رنگ قارچ دادینگتونیا فلگرنس CBS 583.91 چسبیده به کوتیکول نوزاد مرحله سوم هموتکوس کونتورتوس (عدسی شیئی ۴).

تعداد نوزادهای هموتکوس کونتورتوس کاهش یافت اما با افزایش تعداد کنیدی به ۱۰۰۰۰۰ تنها ۴۲/۲۸ درصد کاهش در تعداد نوزادان عفونتزا مشاهده گردید.

بحث

در سالهای اخیر به دلیل مشکلات استفاده از داروهای شیمیایی برای کنترل نماتودهای لوله گوارش نشخوارکنندگان، کنترل زیستی این نماتودها با استفاده از قارچهای فرصت طلب موجود در خاک و مدفوع مورد توجه قرار گرفته است. در بررسی فوق دو جدایه آرتروبوتریس اولیگوسپورا (IRAN 431C = CBS 111.37 و IRAN 432C = CBS 251.82) و یک جدایه دادینگتونیا فلگرنس (IRAN 433C = CBS 583.91) و یک جدایه هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم (IRAN 510C = CBS 381.84) که در بررسیهای متعدد اثر نماتودخواری آنها نشان داده شده بود از موسسه CBS هلند تهیه گردید تا اثر نماتودخواری آنها در شرایط محلی مورد بررسی قرار گیرد.

بررسی اثر نماتودخواری جدایه های قارچهای آرتروبوتریس اولیگوسپورا 111.37 و 251.82 و دادینگتونیا فلگرنس 583.91 حاکی از اثرات نماتودخواری این قارچها بود و با افزایش تعداد کنیدی ها در گرم مدفوع رابطه مستقیم داشت بنابراین حداکثر خاصیت نماتودخواری آنها با افزودن ۱۰۰۰۰۰ کنیدی از جدایه های فوق به محیط کشت حاوی نوزادان عفونتزای هموتکوس کونتورتوس به ترتیب موجب کاهش تعداد نوزادان به میزان ۸۸/۷۹، ۷۹/۸۳ و ۹۰/۱۳ درصد گردید که در هر سه مورد کاهش مذکور نسبت به شاهد به شدت معنی دار بود در ضمن بین اثر نماتودخواری قارچهای فوق نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت. Wharton و Murray در سال ۱۹۹۰ با افزودن کنیدی های آرتروبوتریس اولیگوسپورا به مدفوع گاو و گوسفند آلوده باعث کاهش چشمگیری در تعداد نوزادان عفونتزای موجود در مدفوع و مرتع اطراف دام شدند (۸). Mendoza De Gives و Vazqueaz-Prats در سال ۱۹۹۴ با افزودن ۲۰۰۰۰ کنیدی از قارچهای موناکروسپوریوم ادرماتوم، آرتروبوتریس اولیگوسپورا و آرتروبوتریس روبوستا در گرم مدفوع به ترتیب باعث کاهش ۹۵/۷، ۹۸/۳ و ۱۰/۱ درصد در تعداد نوزادان عفونتزای

همونکوس کونتورتوس در مقایسه با گروه شاهد شدند و هنگامی‌که از مخلوط کنیدی های هر سه قارچ (۶۰۰۰۰ کنیدی) استفاده گردید این کاهش به حدود ۹۷/۴ درصد رسید و با افزودن ۱۰۰۰۰۰ کنیدی در گرم مدفوع از هر قارچ کاهش کلی جمعیت نوزادان مشاهده گردید (۷). در تجربه مشابه دیگری روی گاو در دانمارک نیز نشان داده شد که دو جدایه دادینگتونیا فلگرنس تعداد نوزادهای عفونتزای مرتع را ۸۵-۷۴ درصد کاهش دادند (۴). البته مطالعات اخیر در دانمارک توانایی بهتر قارچ دادینگتونیا فلگرنس را نسبت به جنسهای دیگر قارچهای نماتودخوار مانند جنس آرتروبوتریس، هم در شرایط آزمایشگاهی (۵) و هم در محیط زنده (۶) نشان داد و همان طور که قبلا ذکر شد دلیل آن دیواره ضخیم کلامیدوسپورهای دادینگتونیا می باشد (۱،۲،۳). در مورد جدایه وارداتی قارچ هاپتوسیلیوم اسفروسپوروم 381.84 نیز خاصیت نماتودخواری قابل توجه نبود و با افزایش ۸۰۰۰ کنیدی به محیط کشت حاوی نوزاد ، تعداد نوزادان ۲۸ درصد کاهش یافت ولی با افزایش تعداد کنیدی تا ۱۰۰۰۰۰ میزان نماتودخواری کاهش یافت. اگرچه نمی توان دلیل قانع کننده ای برای این رابطه معکوس ارائه داد ولی به طور کلی این قارچ جایگزین خوبی برای مبارزه با نوزاد نماتودها در شرایط برون بدن نمی باشد. بررسی حاضر در شرایط برون بدن انجام گرفت و اثر قارچها در این شرایط کاملا امیدوارکننده بود ولی به منظور بررسی اثر نماتودخواری قارچ در شرایط درون بدن می بایست مطالعات بیشتری در این زمینه انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا شایسته است که از زحمات جناب آقای پروفسور والتر گمس و جناب آقای دکتر علیرضا خسروی به دلیل راهنماییهای انجام شده در طول تحقیق کمال قدردانی به عمل آید.

References

1. Crespo J. F., Herrera Rodriguez D., Crespo R.F., Liebano Hernandez E., Vazquez Prats V., Mendoza de Gives P. and Ontiveros Fernandez J. (1999): In vitro nematophagous capacity of *Duddingtonia flagrans* maintained under 2 conditions of preservation. *Rev. Latinoam Microbiol.* 41,4:245-9.
2. Fernandez S. A., Larsen M., Henningsen E., Nansen P., Gronvold J., Bjorn H. and Wolstrup J. (1999): Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. *Parasitol.* 119,1:105-11.
3. Githega S. M., Thamsborg S. M., Larsen M., Kyvsgaard N. C. and Nansen P. (1997):The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. *Int. J. Parasitol.* 27: 931-939.
4. Gronvold J., Wolstrup J., Larsen M., Henriksen S. A. and Nansen P. (1993): Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. *J. Helminthol.* 67: 31-36.
5. Larsen M., Wolstrup J., Henrikson S. A., Dackman C., Gronvold J. and Nansen P. (1991): In vitro stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *J. Helminthol.* 65:193-200.
6. Larsen M., Wolstrup J. and Nansen P. (1992):In vitro passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Vet. parasitol.* 66:137-141.
7. Mendoza De Gives P. and Vazquez-Prats V. M. (1994):Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Vet. Parasitol.* 55:197-203.
8. Murray D. S. and Wharton D. A. (1990):Capture and penetration processes of the free-living juvenile of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda) by the nematophagous fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Parasitology* . 101:93-100.
9. Pandey V. S. (1973):Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axe*i and *Ostertagia ostertagi*: A possible method of biological control. *J. Helminthol.* 47,1:35-48.
10. Shepherd A. M. (1961): Nematode-trapping fungi in Danish agriculture soils. *Horticulture.* 15:94-96.
11. Waller P. J. and Faedo M. A. (1996): The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.* 26:915-925.
12. Waller P. J., Knox M. R. and Faedo M. (2001): The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.* 102,4: 321-330.