

НЕМАТОФАГОВЫЕ ГРИБЫ ПРОТИВ ЛИЧИНОК СТРОНГИЛЯТ ЛОШАДЕЙ

Кокколова Л. М.¹,
доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник,
заведующая лабораторией гельминтологии

Гаврильева Л. Ю.¹,
кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
лаборатории гельминтологии

Степанова С. М.¹,
кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник
лаборатории гельминтологии

Слепцова С. С.¹,
аспирант лаборатории гельминтологии

Аннотация

Нематофаговые грибы-гифомицеты найдены практически во всех частях света и в разных климатических зонах. Вероятно, поэтому многими исследователями хищные грибы выделяются из всех образцов почвы, где только могут существовать нематоды. В настоящее время профилактика и лечение нематодозов лошадей табунного содержания у практикующих ветеринарных специалистов ограничивается проведением одноразовой дегельминтизации с применением известных на основе полусинтетических антигельминтных препаратов. Следует отметить, что стратегия антигельминтного лечения направлена на уничтожение паразитов непосредственно в организме животных. В большинстве своем антгельминтные препараты обладая антипаразитарными свойствами, они высокотоксичны для любого теплокровного организма. Химические составляющие противопаразитарных препаратов после введения в организм животных выводятся во внешнюю среду с фекалиями практически без изменения, продолжают свое сильное токсическое влияние на компоненты пастбищного биоценоза. Выделенные из мерзлотной почвы Якутии нематофаговые грибы по описанию вида по морфологическим и физиологическим характеристикам относятся к роду *Arthrobotrys*, определены 2 штамма хищных грибов L₃-1 и L₃-2. Нематофаговые грибы рода *Arthrobotrys*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Якутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное отделение Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М. Г. Сафронова (677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, д. 23/1)

занимают определенное место в системе микробиомедов, которые способны уничтожать нематод.

Ключевые слова: хищные грибы, лошади, личинки, яйца, стронгилята, окружающая среда.

NEMATOPHAGOUS FUNGI AGAINST STRONGYLATA LARVAE OF HORSES

Kokolova L. M.¹,

Doctor of Veterinary Sciences, Chief Researcher,
Head of the Laboratory of Helminthology

Gavrilieva L. Yu.¹,

Candidate of Veterinary Sciences,
Senior Researcher Laboratory of Helminthology

Stepanova S. M.¹,

Candidate of Veterinary Sciences,
Researcher Laboratory of Helminthology

Sleptsova S. S.¹,

Postgraduate Student Laboratory of Helminthology

Abstract

Nematophagous hyphomycetes were found almost in all parts of the world and in different climatic zones. Therefore probably many researchers separate predatory fungi from all soil samples, wherever nematodes can exist. Currently, the prevention and treatment of nematodoses of herd horses by practicing veterinarians is limited to single deworming with the use of known semi-synthetic anthelmintic drugs. It should be noted that the strategy of anthelmintic treatment is aimed at disinfection directly in the body of animals. Most anthelmintic drugs have antiparasitic properties, and are highly toxic to any endothermic organism. Chemical components of antiparasitic drugs after animal use are excreted in the environment with feces, and, being practically unchanged, continue their strong toxic effect on the pasture biocenosis components. The nematophagous fungi isolated from the permafrost soil of Yakutia belong to the genus *Arthrobotrys* according to the description of the species, and by morphological and physiological characteristics; 2 strains of predatory fungi L₃-1 and L₃-2 have been identified. Nematophagous fungi of the genus *Arthrobotrys*

¹ Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Centre The Yakut Scientific Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" – separate division M. G. Safronov Yakut Scientific Research Institute of Agriculture (23/1, Bestuzheva-Marlinskogo st., Yakutsk, 677001, Russia)

occupy a certain place in the system of microbiomes that are able to control nematodes.

Keywords: predatory fungi, horses, larvae, eggs, Strongylata, environment.

Введение. Кишечные стронгилятозы у лошадей — комплекс гельминтозных заболеваний (нематодозов), вызываемые представителями подотряда Strongylata, сем. Strongylidae и Trichonematidae, паразитирующими в половозрелой стадии в толстом отделе кишечника животных. Личиночные стадии локализуются в различных тканях, в зависимости от вида возбудителя. К настоящему времени насчитывают около 45 видов нематод — возбудителей кишечных стронгилятозов лошадей и других однокопытных (ослы, мулы). Все они имеют сходное развитие во внешней среде и характеризуются общим — потенцированным патогенным воздействием на организм, складывающимся из болезнетворного влияния многочисленных отдельных видов стронгилид и трихонематид, которые, как правило, в форме «чистой инвазии» у лошадей не встречаются. При этом популяция инвазионных личинок остается вне зоны действия применяемых в ветеринарной практике антгельминтных препаратов, а популяция нематод с каждым годом увеличивается. Происходит быстрая реинвазия животных, значит наблюдаем кратковременную эффективность антгельминтных препаратов, что является причиной значимых экономических затрат в хозяйствах республики [2].

По данным Gray (1987) [4], Fritsch и Lysek (1989) [5], нематофаговые грибы-гифомицеты найдены практически во всех частях света и в разных климатических зонах. Вероятно, поэтому многими исследователями хищные грибы выделяются из всех образцов почвы, где только могут существовать нематоды [6]. Кроме того, массовое и продолжительное применение одного и того же антигельминтного препарата длительное время приводит к возникновению резистентности гельминтов, причем скорость формирования устойчивых штаммов превосходит возможность химической промышленности по разработке новых эффективных антигельминтных препаратов [3]. Обзор научных работ, посвященных изучению нематофаговых грибов, состоит из результатов проведенных отечественными и зарубежными учеными, опубликованные в различных источниках, журналах начиная от первых сообщений М.С. Воронина в 1864 г. [1] о способности гриба *Arthrobotrys oligospora*, об установлении на конидиях петель Цопфом в 1888 г., исследование разными авторами о значении улавливания и умерщвления нематод микроскопическими грибами.

Цель исследования: изучить представителей микологического биоценоза, определения нематофаговой активности штаммов *Arthrobotrys oligospora* против личинок стронгилят лошадей.

Материалы и методы. Основными объектами исследований были пробы фекалий лошадей, почва, растительность, труха, остатки подстилки скота, остатки кормушек, шерсть.

Всего было исследовано 1503 пробы почвы, из разных местностей, коневодческих хозяйств, конепастбищах в Центральной Якутии: Хангаласский, Намский, Амгинский, Мегино-Кангаласский, в Западной Якутии: Сунтарский, Нюрбинский, Вилюйский улусы республики.

Исследование собранных образцов были проведены в лаборатории гельминтологии ФГБНУ «Якутский НИИСХ им. М.Г. Сафронова» методом посева из серийных разведений на агаризованные питательные среды. Также микологическому исследованию подвергнуты растительность, травы тебеневочных пастбищ, собранные в разные сезоны года, всего было исследовано 685 проб. Материалы для изучения были собраны из Амгинского – 28, Чурапчинского – 22, Мегино-Кангаласского – 180, Усть-Алданского – 34, Хангаласского – 101, Намского – 60, Сунтарского – 180, Верхневилуйского – 44, Вилюйского районов – 36. Для выделения нематофаговых грибов исследованы почва, растительный покров, шерсть и фекалии животных, труха дерева и гниющие растительные остатки, листовой перегной, компост, остатки корма из денников скотопомещения, всего исследовано 332 пробы. Посев проводили на питательной среде Чапека (для грибов), содержащий дрожжевой экстракт и контроль. Среду Чапека (для грибов) разливали по стерильным чашкам Петри толщиной 0,3 мм для того, чтобы хорошо просматривались под микроскопом выращенные колонии гриба. Для посева отобранных проб гнилой древесины, а почва мерзлотно-палевая, суглинистая, дерново-подзолистая, лугово-черноземная, содержимое кормушек, растительный покров пастбищ, остатки стога сена, прямого кишечника молодняка лошадей, фекалии от основного поголовья лошадей, перегнившего навоза, компоста, мульчи, древесной трухи и шерсти лошади брали по 1 г переносили в 10 мл дистиллированной воды, периодически встряхивая, оставляли на 30 мин, затем из водной суспензии пробы отбирали по 0,5 мл, инокулировали на питательную среду, затем вносили культивированные личинки стронгилят: на опытных чашках с № 1–3 по 10 экз. личинок, № 4–6 по 30 экз. личинок, № 7–9 по 100 экз. личинок. Ставили в термостат при постоянной температуре +28 °С.

Результаты исследований. Наибольшая зараженность молодняка лошадей за время наблюдения была выявлена в хозяйствах Центральной Якутии у жеребят в возрасте от 3 до 6 месяцев 100%, у молодняка в возрасте 9–12 месяцев в летнее время стронгилятозная инвазия составляла 100%, осенне-зимнее время года в среднем – $99,2 \pm 6,8\%$. Показатель экстенсивность стронгилятозной инвазии у молодняка до 2-х летнего возраста не уменьшается и составляет в среднем до $89,7 \pm 7,1\%$, по сезонам года зимой – $68,7 \pm 4,21\%$, летом – $79,1 \pm 6,01\%$ и весной – $81,2 \pm 6,33\%$, у молодняка до 3 лет в среднем яйцами стронгилят были заражены до $75,2 \pm 6,5\%$, по сезонам года зимой – $78,3 \pm 5,3\%$, летом – $71 \pm 5,91\%$ и весной – $66,3 \pm 4,81\%$. Такие показатели эпизоотического проявления наиболее распространенных стронгилятозов в коневодческих хозяйствах Западной Якутии также показывают значительные инвазии, у жеребят до 9–12 мес. $92,5 \pm 5,5\%$, в зимний период у молодняка 2-х летнего возраста составляло $74,5 \pm 8,1\%$, весенний – $94,2 \pm 5,3\%$, в 3-х летний период составило до $63,3 \pm 6,21\%$, при средней интенсивности инвазии $\approx 539,8 \pm 60,7$ яиц в 1 г фекалии в зимний период и $\approx 1562,8 \pm 30,2$ экз. в теплое время у одного животного. В результате на пастбищах, расположенных на мерзлотных почвах Якутии, происходит бесспорное замедление процесса разложения органических отходов, при этом популяция инвазионных личинок остается вне зоны действия и популяция нематод с каждым годом увеличивается, происходит загрязнение окружающей среды.

Изучение представителей микологического биоценоза показало, что чаще всего встречаются плесневые грибы рода *Mucor*, это почвенные грибы, предпочитающие холодный и умеренный климат, из числа исследованных проб в 360 пробах выделены грибы рода *Mucor*, что составило 52,5%. Анализ микологических данных показал, из них в 283 пробах (41,3%) грибов рода *Mucor* был выявлен в присутствии органического материала. Токсигенные грибы рода *Aspergillus niger* – это высший плесневый гриб, был обнаружен в 155 пробах (22,6%), *Aspergillus nidulans* – плесневый грибок из рода аспергилл в 67 пробах (9,78%) и *Fusarium* – несовершенный плесневый гриб, гифомицет в 137 (20%), *Penicillium glabrum* – плесневый гриб, образующийся на продуктах питания и вследствие этого портящих их, обнаружен в 37 пробах (10%), *Trichoderma* sp. почвенный мицелиальный гриб в 14 пробах (3,88%), *Cladosporium* sp. микроскопические «черные грибы» в 12 пробах (3,35%), *Chrysosporium* sp., хризоспориум, являющийся сапрофитом почвы гриб, считающийся одним из загрязняющих среду

гиалиновый гифомицет, в 11 пробах (3,05%), *Gliocladium* sp. митоспорический, нитчатый гриб в 10 пробах (2,77%), *Bacillus* (Манкау, 1961) сенная палочка, грамположительная спорообразующая аэробная почвенная бактерия в 14 пробах (2,04%) и другие микроскопические грибы и бактерии.

Нематофаговые грибы рода *Arthrobotrys* занимают определенное место в системе микробиомедов, у них выраженная способность уничтожать личинок нематод, значит возможность бороться с возбудителями паразитарных болезней и энтомовредителями. Нематофаговые грибы, в том числе и представители рода *Arthrobotrys*, как и другие несовершенные грибы, имеют хорошо развитый мицелий, но их гифы обладают способностью образовывать специальные, ловчие приспособления. Эти ловчие аппараты у выделенных нами штаммов *Arthrobotrys oligospora* L₃-1 и *Arthrobotrys oligospora* L₃-2 имеют вид колец и петель и их сложное сплетение сети. Такие сети образуются в результате обильного ответвления гифов, веточки которых загибаются и анастомозируют с соседними веточками, образуя сложную трехмерную сеть из многочисленных колец. Поверхность гифа типа ловушки образуют и выделенные нами штаммы L₃-1 и L₃-2 *Arthrobotrys oligospora*.

Для определения нематофаговой активности штаммов *Arthrobotrys oligospora* против личинок стронгилят нами были проведены лабораторные опыты. Для посева штаммов берем мицелии из 3-х суточной культуры гриба в объеме с титром $4,0 \cdot 10^4$ спор (с расчетом 4 мл с на 100 мл среды). На опытных и контрольных чашках тщательно просматриваем рост гриба на среде, под малым увеличением микроскопа. Учет роста гриба начинаем с 3-х суток после посадки личинок стронгилят в количестве 100 экз., отметили бурный рост обоих штаммов L₃-1 и L₃-2. Проводим измерения макроконидий для определения скорости разрастания штаммов. После посадки личинок стронгилят уже на 3 сутки наблюдаем увеличение биомассы, подсчет биомассы проводили по абсолютно сухому весу, достигало значения 12–18 г/л, что свидетельствует о формировании к третьим суткам роста многочисленных спиралевидных гифов, что ранее было отмечено в условиях роста маточной культуры. В этот же период был отмечен, что на гифах формирование ловчих петель в виде кольца при захвате одиночных личинок, что характерно для данного штамма (рис. 1).



Рис. 1. Личинка *Strongylus equinus*, схваченная петлей гриба

При этом в полости личинки проникают многочисленные споры и заселяются внутри личинок, опустошая содержимое, умерщвляя и изменяя структуру (рис. 2).

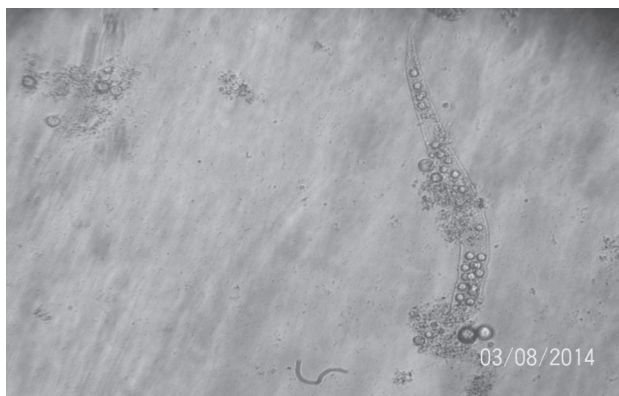


Рис. 2. Споры гриба *Arthrobotrys oligospora* заселяются внутри личинок *Strongylus equinus*, умерщвляя заполняют трофическими гифами

Быстрый рост колоний гриба и образование ловчих колец в результате разветвления веточек гифа образуют сложную сеть из ловчих колец. В сетях этого кольца и удерживаются личинки стронгилят.

Под микроскопом наблюдали изменения в структуре личинок, полость личинок заполнялась трофическими гифами штаммов нематофагового гриба.

Число же улавливающих приспособлений разрасталось и становилось состоящим из сплошных сплетений ловчего аппарата, по всей поверхности питательной среды.

Заключение. Нематофаговые грибы *Arthrobotrys oligospora* занимают определенное место в системе микробиомедов, которые способны уничтожать нематод, бороться с возбудителями паразитарных болезней и энтомовредителями. Выделенные из мерзлотной почвы Якутии нематофаговые грибы по описанию вида по морфологическим и физиологическим характеристикам относятся к роду *Arthrobotrys*, определены как два штамма хищных грибов L_3-1 и L_3-2 .

Лабораторные опыты по определению нематофаговой активности штаммов *Arthrobotrys oligospora* L_3-1 и L_3-2 показывают, при пересеве спор на питательные среды, из 3-х суточной глубинной мицелиальной культуры обильно разрастаются при наличии личинок стронгилят, образуя механическую ловушку в виде колец и сетей. Таким образом, присутствие личинок стронгилят у нематофагового гриба способствует быстрому образованию ловчего аппарата.

Экспериментальные опыты по способу применения мицелиальной массы штаммов *Arthrobotrys oligospora* L_3-1 и L_3-2 показали, что на питательной среде ловчие кольца захватывают личинки, схватывая личинку вследствие увеличения объёма ловчего аппарата, внедряют в нее свои гифы и опустошают содержимое личинки.

Как мы знаем, личинкам стронгилят во внешней среде необходимо пройти полный цикл развития, а штаммы нематофаговых грибов *Arthrobotrys oligospora*, увеличивая свой репродукционный потенциал, уничтожают личинки, что значительно затормаживает процесс освоения личинками стронгилят окружающего пространства.

Литература

1. *Воронин М.С.* Микологические исследования. СПб., 1869. С. 6.
2. *Кокколова Л.М.* Хищные грибы из мерзлотных почв Якутии методика выделения и исследования // Матер. докл. межд. научн. конф. Чебоксары. 2017. С. 12-13.
3. *Теплякова Т.В.* Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. Новосибирск, 1999. 252 с.
4. *Grey N.F.* Nematophagous fungi with particular reference to their ecology // *Boil. Rev.* 1987; 62: 245-304.
5. *Fritsch A., Lysek G.* Hyphomycetes capturing nematodes from soils over xerophytic calcareous rocks in upper Bavaria // *Botanica Acta.* 1989; 102: 270-275.
6. *Waller P.J.* To wards sustainable nematode parasite control of livestock // *Veterinary Parasitology.* 1993; 48: 295-309.

References

1. *Voronin M.S.* Mycological studies. St. Petersburg, 1869. P. 6. (In Russ.)
2. *Kokolova L.M.* Predatory fungi from permafrost soils of Yakutia: methods of isolation and research. *Materials of the report of the International Scientific Conference.* Cheboksary. 2017. P. 12-13. (In Russ.)
3. *Teplyakova T.V.* Bioecological aspects of the study and use of predatory Hyphomycetes fungi. Novosibirsk, 1999. 252 p. (In Russ.)
4. *Grey N.F.* Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Boil. Rev.* 1987; 62: 245-304.
5. *Fritsch A., Lysek G.* Hyphomycetes capturing nematodes from soils over xerophytic calcareous rocks in upper Bavaria. *Botanica Acta.* 1989; 102: 270-275.
6. *Waller P.J.* To wards sustainable nematode parasite control of livestock. *Veterinary Parasitology.* 1993; 48: 295-309.