

段栓成,张宇坤,吴晓玉,等. 淡紫灰链霉菌 X33 发酵产物的毒性试验评价[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):275-276.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.090

淡紫灰链霉菌 X33 发酵产物的毒性试验评价

段栓成,张宇坤,吴晓玉,王国秀

(江西农业大学生物科学与工程学院/江西省南昌市发酵应用技术重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:利用小白鼠进行急性和亚急性经口毒性试验,研究抑制柑橘绿霉病菌的淡紫灰链霉菌菌株 X33 无菌发酵液对小鼠的毒性,并测定小白鼠血常规指标,观测小鼠主要脏器。结果表明,菌株 X33 无菌发酵液的小鼠 $LD_{50} > 10.0$ g/kg,受试物属于无毒级物质;小白鼠经 28 d 喂养,各试验组小白鼠生长发育良好,体质量、食物利用率及血常规与对照组之间无显著差异;对小白鼠肝、肾、脾、胃、肠、十二指肠、睾丸(或卵巢)等主要脏器进行组织解剖,均未见病变。淡紫灰链霉菌菌株 X33 无菌发酵液对小鼠安全、无毒。

关键词:淡紫灰链霉菌 X33;无菌发酵液;毒性试验;小白鼠;血常规

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0275-02

柑橘采后损失主要由霉菌、酵母菌、细菌等病原菌侵染造成,其中,柑橘青霉病和绿霉病是柑橘采后主要的两大贮藏病害。据统计,由于青霉病和绿霉病感染导致的柑橘采后损失率为 30%~50%^[1]。目前,柑橘采后病害主要使用化学药剂进行防治,这容易污染环境,使病原菌产生抗药性,防病效果降低^[2]。此外,频繁和高浓度使用化学药剂,不仅会影响果实的自然风味和质构,果实表面还会存在残留,威胁消费者的健康和安全。

生物防治是采用微生物菌株或抗生素类物质,通过喷洒或浸渍果实处理,以降低或防治果实采后病害的保鲜方法,高效、无毒、生产成本低廉,是未来的发展方向^[3]。江西南昌市发酵应用技术重点实验室以柑橘绿霉病菌为靶标,开展菌株的分离和筛选研究,从土壤中分离筛选到 1 株淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*),命名为淡紫灰链霉菌 X33,其产生的生物活性物质对柑橘绿霉病菌、柑橘青霉病菌、柑橘酸腐病菌等多种病原菌均有较强的抑制活性,有望开发为新型的柑橘采后防腐剂。本研究通过对淡紫灰链霉菌 X33 发酵液进行毒理学试验,旨在探讨淡紫灰链霉菌 X33 发酵液的使用安全性,为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 淡紫灰链霉菌 X33,由江西省南昌市发酵应用技术重点实验室分离得到。

1.1.2 受试物 淡紫灰链霉菌 X33 在 28 ℃、200 r/min 下摇瓶发酵培养 3 d,发酵液经 6 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,即得无菌发酵液。

收稿日期:2014-04-19

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2011GB2C50017);江西省教育厅科技落地计划;江西省赣鄱英才“555”工程。

作者简介:段栓成(1990—),男,硕士研究生,从事微生物资源利用研究。E-mail:shuancheng90@126.com。

通信作者:吴晓玉,女,博士,教授,从事微生物资源开发利用工作。E-mail:xywu166@163.com。

1.1.3 试验动物及试剂 远交昆明小鼠,自南昌大学医学院购买;所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 急性经口毒性试验 选用体质量为 18~22 g 的小白鼠 20 只,分 2 个试验组,每组雌雄各 5 只,采用一次性经口灌胃方式,灌胃菌株 X33 无菌发酵液 20 mL/kg,剂量相当于 10 g/kg;另取 10 只小白鼠(雌雄各半),给清水作为对照。小鼠首次饲喂时,隔夜空腹,禁食 16 h,仅喂水;试验前先正常饲喂 3 d,使其适应试验环境。灌胃后,连续 14 d 观察小白鼠的行为状况、中毒症状,记录各组实验小鼠死亡数,并及时剖检并记录结果。

1.2.2 亚急性经口毒性试验 选小白鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半。试验设灌胃菌株 X33 发酵液 1、0.5、0.01 g/kg 共 3 个剂量组,以灌胃蒸馏水为对照组。每天观察并记录各组小白鼠的体征表现、行为、中毒症状和死亡情况^[4]。自由进食饮水,每周称量 1 次体质量,记录饮水量、食物摄入量,计算食物利用率^[5]。

1.2.3 发酵液对小白鼠血常规指标和主要脏器的影响 亚急性经口毒性试验结束,从每笼中随机抓取 3 只小白鼠,颈椎脱臼法处死,立即用注射器插入心脏采集血液,分析血液生化指标,并同时组织解剖检查。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

试验期间,各试验组小白鼠饮食和活动正常,生长发育良好,体质量有所增加,未见任何明显中毒表现,也无死亡;小白鼠喂养 14 d 进行解剖,肉眼观察其心、肝、脾、肺、肾、肠等脏器,与对照组相比,皆未发现明显病变和差异。紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液的饲喂剂量达 10 g/kg 时不会引起小白鼠死亡,按现行 2005 年《化学品毒性鉴定技术规范》急性经口毒性试验的毒性分级标准^[6]划分,受检物属于无毒级物质。

2.2 亚急性经口毒性试验

2.2.1 一般观察结果 喂养 28 d,对照组与喂养组小白鼠均未出现死亡现象,各处理组小白鼠的生长状况、行为状态、外

观体征、饮食和排便等均与对照组差异不明显,淡紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液对小白鼠生理功能损害不明显。

2.2.2 喂养 28 d 的小白鼠进食量和食物利用率 由表 1 可知,各处理组与对照组之间差异不显著 ($P>0.05$),淡紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液喂养小白鼠,对小白鼠体质量增加、进食量和食物利用率影响不明显。

2.3 发酵液对小白鼠血常规指标的影响

由表 2 可知,各饲养剂量组的小白鼠红细胞、白细胞、血小板及血红蛋白数均在正常范围之内,淡紫灰链霉菌 X33 发酵液对小白鼠的血常规指标影响不明显。

表 2 淡紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液对小白鼠血常规指标的影响

组别 (g/kg)	红细胞总数($\times 10^9$ 个/L)		白细胞总数($\times 10^9$ 个/L)		血小板总数($\times 10^{11}$ 个/L)		血红蛋白浓度(g/L)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	7.51 \pm 2.32	9.03 \pm 1.45	12.13 \pm 5.44	14.56 \pm 4.72	1.91 \pm 0.68	2.21 \pm 1.13	275 \pm 7.89	267 \pm 8.33
0.5	6.75 \pm 2.78	6.13 \pm 3.05	18.45 \pm 3.48	15.78 \pm 4.56	1.32 \pm 0.97	1.42 \pm 1.02	256 \pm 6.45	275 \pm 7.32
0.01	7.28 \pm 3.78	8.32 \pm 3.33	17.37 \pm 4.89	16.39 \pm 3.77	2.38 \pm 1.36	2.46 \pm 1.45	270 \pm 8.53	245 \pm 9.45
CK	8.00 \pm 1.89	7.38 \pm 2.03	14.14 \pm 4.19	15.38 \pm 3.78	1.89 \pm 0.56	2.08 \pm 0.78	289 \pm 4.35	288 \pm 6.54
参考值(雄/雌)	3.60 ~ 13.00		4.0 ~ 19.0		1 ~ 3			

2.4 发酵液对小白鼠主要脏器的影响

对各组小白鼠进行组织解剖,发现各处理小白鼠肝、肾、脾、胃、肠、十二指肠、睾丸和卵巢等主要脏器的颜色、形状、大小均未见病理改变,未见膀胱、肝胆管结石,肝体比、肾体比、脾体比、睾丸体比和卵巢体比等脏器参数与对照组差异不显著 ($P>0.05$),较长期服用淡紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液对小白鼠的组织解剖学结构影响不明显。

3 结论与讨论

拮抗微生物可利用其代谢产物抑制病原菌的生长繁殖,其产生的抑菌活性物质种类繁多,主要有细菌素、挥发性物质、蛋白酶类、脂肽及多肽类等等,这些物质通过干扰敏感病原菌的代谢过程而抑制其生长^[7]。以枯草芽胞杆菌为例,人们已从枯草芽胞杆菌不同菌株中分离出几十种抗菌物质,在柑橘病害防治中显示出巨大潜力。Leelasuphakul 等从土壤中分离到 205 株枯草芽胞杆菌,其中 23 株对柑橘绿霉病菌均具有较好的拮抗性,有望开发为柑橘采后保鲜的生防菌^[8]。淡紫灰链霉菌不同种类菌株可发酵产生链丝菌素、薰衣草菌素、中生菌素和农抗 402^[9-10],可用于防治番茄灰霉病、番茄叶霉病、葡萄白腐病、西瓜枯萎病和苹果轮纹病等^[9,11-15]。

江西省南昌市发酵应用技术重点实验室从土壤中分离筛选得到淡紫灰链霉菌 X33,其发酵产物对柑橘绿霉病菌、柑橘青霉病菌、柑橘酸腐病菌等多种植物病原菌均有较强的抑制活性,而有关淡紫灰链霉菌用于防治柑橘采后绿霉病的相关毒理学试验未见研究报道。本试验结果表明,淡紫灰链霉菌 X33 发酵产物对小白鼠 LD₅₀ > 10g/kg,属安全无毒物质;小白鼠喂养发酵液 28 d,其行为体征、生长发育、体质量增加量、食物利用率、血液生化指标、脏器及组织病理学的不良影响均不明显,可见淡紫灰链霉菌 X33 发酵液对小白鼠具有较好的安全性。

参考文献:

[1] 邓伯勋. 园艺产品贮藏运销学[M]. 北京:中国农业出版社,

表 1 淡紫灰链霉菌 X33 无菌发酵液对小白鼠食物利用率的影响

组别 (g/kg)	平均增质量(g)		食物消耗(g)		食物利用率(%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1.00	16.95	19.77	339.12	282.93	5.00a	6.99ab
0.50	17.12	19.69	339.48	282.85	5.04a	6.96ab
0.01	17.27	20.01	339.36	283.27	5.09a	7.06ab
CK	16.84	19.28	339.52	283.07	4.96a	6.81b

注:相同小写字母表示在 0.05 水平上差异不显著;不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

2002;121.

[2] 王 雷. 果蔬采后病害的发生及控制病害的主要方法[J]. 蔬菜,2009(12):34-36.

[3] Spadaro D, Gullino M L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(2):185-194.

[4] 李 进, 原 惠, 曾献春, 等. 黑果枸杞色素的毒理学研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7):470-475.

[5] 刘天明, 孙丙升, 于莎莎, 等. 天然白地霉菌株发酵产品的毒理安全性评价[J]. 中国酿造, 2009(5):87-90.

[6] 赵 文. 食品安全性评价[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.

[7] 郭娟华, 涂起红, 陈楚英, 等. 拮抗微生物防治柑橘采后病害研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(23):351-356.

[8] Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48(1):113-121.

[9] 谢晨昭, 杨毅玲, 李 磊, 等. 拮抗放线菌 B1 菌株鉴定及其防治番茄灰霉病的初步研究[J]. 植物保护学报, 2008, 35(4):300-306.

[10] 朱昌雄, 蒋细良, 孙东园, 等. 新农用抗生素——中生菌素[J]. 精细与专用化学品, 2002(16):14-17.

[11] 何其瑞. 淡紫灰链霉菌 Xjy 发酵过程的优化及对大棚番茄叶霉病的防治[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.

[12] 崔贵青, 王连君, 姜 楠, 等. 葡萄白腐病拮抗链霉菌 G4 的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2):147-151.

[13] 易 龙, 张 亚, 廖晓兰, 等. 链霉菌防治植物病害的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3):91-95.

[14] 赵丽明, 丁延芹, 路晓萌, 等. 西瓜根际枯萎病拮抗放线菌的筛选及鉴定[J]. 生物技术通报, 2010, 05(5):107-110.

[15] 何其瑞, 黄丽丽. 一株淡紫灰链霉菌对采后苹果果实轮纹病的防治效果[C]//彭友良, 朱有勇. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社, 2009.