

漆斑菌 W_{96} 株产毒观察

梁增辉 杨宗芬 程义勇 蒋兴锦

(军事医学科学院军队卫生研究所)

摘要 在一次卫生调查中我们从我国北方储水池表面生长的一层霉菌漂浮物中分离到一株漆斑菌 (*Myrothecium* W_{96})，经纯化培养后在实验室中用玉米、小麦和大米天然培养基中培养，然后用培养物的粗提物进行兔子皮肤过敏试验和豌豆发芽抑制试验。试验表明漆斑菌 W_{96} 株的玉米和小麦培养物的粗提物可使兔子皮肤出现红肿、起疱等过敏症状；豌豆发芽抑制试验结果也发现有毒性反应。兔子皮肤过敏试验和豌豆发芽抑制试验表明这株漆斑菌能产生霉菌毒素。

关键词 真菌；霉菌毒素；真菌培养；漆斑菌

文献早有报道^[1,2]漆斑菌属 (*Myrothecium*) 有些种能产生抗生物质——胶霉毒素 (Gliotoxin) 和类似野葛树毒素 (*Rhus toxicodendron*) 样的致皮炎物质。据说牛羊吃了被漆斑菌污染的草出现了漆斑菌毒素中毒症。漆斑菌毒素对小白鼠、大白鼠、兔、狗、猪和猴都有明显的毒性^[2]。我们在一次卫生调查中，偶然从储水表面长满霉菌的漂浮物中分离到一株漆斑菌 (W_{96} 株)。在实验室中用天然培养基培养，将培养物的粗提物进行毒性检测，发现漆斑菌 W_{96} 株能产生霉菌毒素，现将实验结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株

漆斑菌 (*Myrothecium*) W_{96} 株系从我国北方储水池表面生长的一层霉菌漂浮物中分离得

到，霉菌生长的环境气温为 11.8—12.7℃ (连续四年相同季节四次测量的气温)，霉菌生长在阴暗无光照的储水表面上。分离到的菌种经实验室纯化培养，经中国科学院微生物研究所鉴定为漆斑菌属 (*Myrothecium*)。漆斑菌 W_{96} 株在蔡氏培养基上 28℃ 培养 14 天，菌落 (见图 1) 4—5cm，有胶状分泌液滴，菌丝无色，分生孢子层绿黑色，菌落边缘白色。

(二) 培养基

1. 斜面培养基：菌种分离和纯化使用马铃薯琼脂斜面和蔡氏培养基斜面。

2. 天然培养基：为了观察漆斑菌的产毒性，分别在罗氏瓶中放入玉米、大米和小麦天然培养基，加自来水浸泡，玉米和小麦浸泡 24 小

本试验中分离的菌种承蒙中国科学院微生物研究所齐祖同教授帮助鉴定，特此表示感谢。

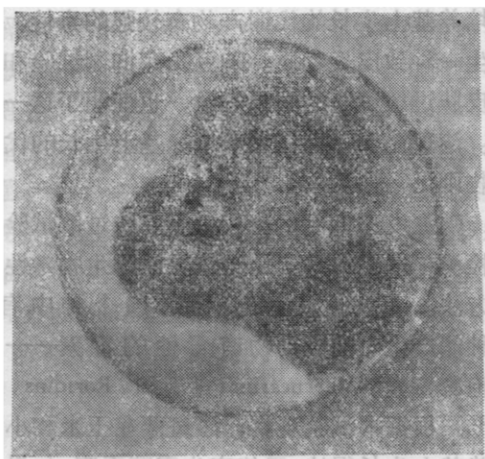


图1 漆斑菌 W₉₆ 株的菌落形态

时,大米浸泡2小时,沥去水份,以 $1\text{Kg}/\text{cm}^2$ 蒸汽压灭菌30分钟,灭菌二次。

(三) 粗提物的提取

将漆斑菌 W₉₆ 株接种于马铃薯琼脂斜面上 28°C 培养14天。然后分别转种于经两次灭菌的玉米、大米和小麦三种天然培养基中, 28°C 培养2周,每天摇动一次。培养物经流通蒸气杀死所培养的霉菌后, 70°C 减压干燥。称取培养物50g,加150ml 甲醇:1% 氯化钠(55:45),振荡2小时,过滤后再加上上述溶剂150ml,再振荡提取一次,滤液经减压蒸干后加20ml 甲醇溶解,用10ml 正己烷分配提取2次,在甲醇溶液中加入10ml 氯仿:乙酸乙酯(1:1),萃取二次,将氯仿蒸去,得油状粗提物供毒性检测用。

(四) 毒性检测

1. 豌豆发芽抑制试验: 参考 Burmeister^[3] 法,将无病豌豆种经0.1% 氯化汞溶液浸泡消毒20分钟,用无菌蒸馏水洗涤3—4次。将漆斑菌 W₉₆ 株培养物的粗提物溶于丙酮中,浓度为 $4\text{g}/\text{ml}$ (以干培养物计,以下同),取1ml置于消毒的培养皿内的滤纸上,待丙酮挥发干后,加入4ml 含0.1% 洁洁灵的无菌水稀释,使测定浓度相当于 $1\text{g}/\text{ml}$ 。每皿放10粒豌豆, 28°C 放3天,同时以非污染霉菌的玉米、大米和小麦三种天然培养基的粗提物作空白对照。

2. 兔子皮肤刺激试验: 根据 Chung 的方法^[4]取2Kg左右白毛幼兔,将背部和两侧的毛剪去,剃光。将溶于丙酮中粗提物浓度为 $40\text{mg}/\mu\text{l}$

(以干培养物计),取 $10\mu\text{l}$ 滴于兔子皮肤上,涂开约一平方厘米的面积,同时以非污染霉菌的大米、玉米和小麦三种培养基的粗提物作空白对照。

结果与讨论

(一) 豌豆发芽抑制试验

漆斑菌 W₉₆ 株在玉米、大米和小麦三种培养基上培养的粗提物对豌豆发芽的抑制率见表1。

表1 漆斑菌 W₉₆ 株粗提物对豌豆发芽的抑制率(%)

提取物样品	平均抑制率	对照*
玉米培养物	97.7	6.0
小麦培养物	95.2	2.0
大米培养物	7.0	6.0

* 指正常豌豆不发芽率。

根据 Burmeister^[3] 报道,霉菌毒素和 T₂ 毒素含 $2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对豌豆发芽抑制率为90%以上; T₂ 毒素含 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下时,抑制率为10%以下。从表1结果表明,漆斑菌 W₉₆ 株在玉米和小麦培养基上培养的粗提物对豌豆发芽抑制率达97.7%和95.2%,说明粗提物中含有较多的霉菌毒素。而在大米培养基上培养的粗提物没有毒性反应。

(二) 兔子皮肤过敏试验

将漆斑菌 W₉₆ 株的大米、玉米和小麦培养物的粗提物 $10\mu\text{l}$ 在兔子皮肤上涂抹,其毒性见表2和图2、3。

表2 漆斑菌 W₉₆ 株培养物粗提物对兔子皮肤的毒性作用

提取物样品	皮肤毒性反应等级			
	1天	3天	5天	7天
小麦培养物	+	++	+++	++++
玉米培养物	-	+	+++	++++
大米培养物	-	-	-	-

注:“-”非污染霉菌的小麦、玉米和大米培养物的粗提物为阴性,皮肤无反应;“+—+++”皮肤红肿,起水泡;“++++”皮肤组织坏死。

从表2和图2、3看到,涂药后可使兔子皮

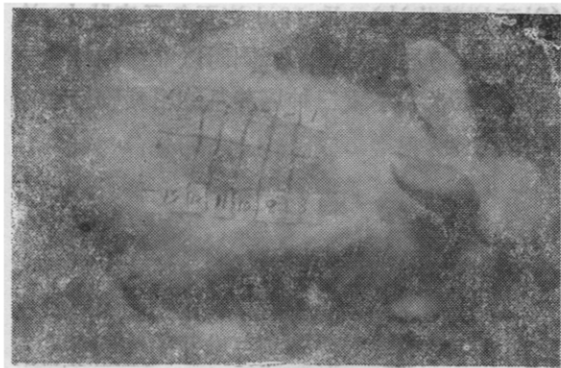


图2 漆斑菌 W₆ 株玉米培养粗提物对兔子皮肤的毒性作用 (图中 11 为涂药后第 7 天引起的皮肤组织坏死)

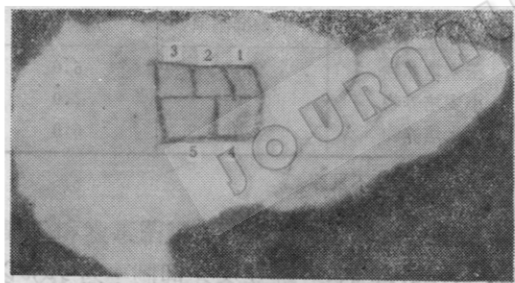


图3 漆斑菌 W₆ 株小麦培养粗提物对兔子皮肤的毒性作用 (图中 4 为涂药后 24 小时内皮肤红肿, 第 7 天损伤部位结痂)

麦培养基上生长的代谢产物有较强的毒性, 能产生一种致皮炎物质。豌豆发芽抑制试验和兔子皮肤过敏试验的结果一致, 也证明了这一结论。漆斑菌 W₆ 株在大米培养基上生长的代谢产物则无毒性反应。

豌豆发芽抑制试验和兔子皮肤过敏试验用于检测单端孢霉毒素是比较灵敏的生物毒性检测方法。据文献报告漆斑菌属 13 个种中有 3 个种能产生对哺乳动物有毒性的毒素——单端孢霉毒素、Verrucarins 毒素和 Roridins 毒素^[2]。根据本试验观察, 漆斑菌在玉米和小麦培养基上生长很快, 又能产生霉菌毒素, 如果误食被漆斑菌污染的粮食可能有中毒的危险, 应予以重视。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所: 常见与常用真菌, 科学出版社, 第 240 页, 1973。
- [2] Wyllie, T. D. et al.: *Mycotoxin Fungi, Mycotoxin, Mycotoxicoses, Encyclopedic Handbook*, Vol. I. Marcel Dekker Inc. New York and Basel, 1977.
- [3] Burmeister, H. R. et al.: *Appl. Microbiol.* **20**: 437, 1970.
- [4] Chung, C. W. et al.: *Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**: 1121, 1974.

肤出现红肿、起疱等过敏症状, 第 7 天出现组织坏死。此结果说明, 漆斑菌 W₆ 株在玉米和小