

用鼠伤寒沙门氏菌/微粒体试验系统检测灭蚊 链霉菌制剂致突变作用的初报

黄为良 邓秀莲 谢以权

(广东省昆虫研究所, 广州)

胡优班 康亚男 邹云珍

(广东省微生物研究所, 广州)

灭蚊链霉菌 (*Streptomyces culicidicus*) 制剂, 经室内外 300 多次试验证实, 对库蚊、按蚊、阿蚊幼虫有显著的毒效, 对几种农业害虫如红萍红丝虫、萍螟、萍灰螟等亦有较好的毒杀效果, 田间使用菌粉稀释 5—7 万倍, 可杀死上述害虫 80% 以上^[1]。故该制剂是目前开展蚊虫和农业害虫生物防治的一种较好的微生物杀虫剂。对其毒性的研究, 自 1973 至 1977 年曾对关系最大的几种动物进行急性、亚急性和慢性毒性试验, 结果均未显示中毒现象。为了进一步了解此制剂对人畜的安全性, 特别是否有致癌性, 我们利用 Ames 提出的微生物诱变试验法^[2] 对其进行致突变作用检测。现将试验结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

微生物诱变法用的菌种是组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 变异株。该菌受诱变物作用可产生回复突变 (简称“回变”), 根据回变菌落出现的情况, 可判断受检物是否有诱变性。但有些受检物需经宿主代谢激活后才具有诱变作用, 因此检测这类物质时需加入活化系统。本试验所用的检测菌种是鼠伤寒沙门氏菌突变株 TA₉₈ 和 TA₁₀₀。TA₉₈ 用于检测引起移码型诱变物, TA₁₀₀ 用于检测引起碱基置换型诱变物。此外这些菌株还具有深粗糙型 (*rfa*) 突变, 缺失 DNA 损伤的修补能力和带有 R-因子等特性。在检测待测样品

前, 按照 Ames 的鉴定方法, 鉴定上述两个菌株的特性, 符合要求的菌株接种于肉汤培养基, 37°C 摇床培养 14—16 小时, 作样品检测用。

(二) 培养基

1. 普通肉汤培养基

2. 肉汤琼脂: 肉汤培养基加琼脂 1.7%

3. 上层培养基: 琼脂粉 0.6%, NaCl 0.5%, pH 7.0, 在每 100 ml 软琼脂培养基中加 10 ml 0.5 mM 组氨酸-0.5 mM 生物素溶液。

4. 底层培养基: 琼脂 1.5%, 葡萄糖 2%, Vogol-Bonner 溶液 (Mg SO₄ · 7 H₂O 0.2%, K₂HPO₄ 10%, 柠檬酸 2%, NaNH₄ HPO₄ · 4H₂O 3.5%) 10%, pH 7.0。

(三) 微粒体激活系统的制备

选体重约 200 g 的雄性大白鼠, 按大鼠体重用聚氯联苯 500mg/kg (聚氯联苯用玉米油稀释) 一次腹腔注射, 五天后处死, 在无菌条件下取出肝脏, 加入肝重 3 倍量的冷冻 0.5 M KCl, 用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆。经 9000 g 离心 10 分钟, 取其上清液分装小玻璃管中, 每管 2ml 左右, 置 -40°C 冰箱保存, 即为 S-9, 使用时按所需量加入辅助因子, 制成 S-9 混合物 (每毫升混合物含: S-9 150 μl, 0.4 M Mg Cl₂ 20 μl, 1.65 M KCl 20 μl, 1 M 6-磷酸葡萄糖 5 μl, 0.1 M 辅酶 II (NADP) 40 μl, 0.15 M 磷酸缓冲液 765 μl)。每皿加入 0.5 ml。

(四) 受试物的制备

取一定量的灭蚊链霉菌菌粉加入 4 倍量的

95%工业乙醇或丙酮(重量/体积),装入三角烧瓶中,密封摇匀,浸泡4小时,过滤,取滤液置4℃冰箱保存(即为受试物)。受检前,先用致乏库蚊幼虫进行测定,检测灭蚊效果,结果该受试物灭蚊幼虫90%以上的有效浓度约为未经抽提菌粉的二分之一。进行诱变试验时,将受试物按所需浓度用无菌水稀释备用。

(五) 诱变试验

1. 点试法: 在2ml上层软琼脂(45℃)中,加入0.1ml菌液和0.5ml S-9混合物(不加S-9混合物的则加0.5ml磷酸缓冲液)摇匀后立即倒入底层培养基平板上成一薄层。将浸有不同浓度受试物的滤纸片(直径为6mm)放置其上,同时放浸有已知致癌物的滤纸片作为阳性对

照。37℃培养48小时观察结果,若为阳性,则在滤纸片周围出现密集的回变菌落。

2. 掺入法: 在上层琼脂中加入0.1ml菌液,0.1ml受试物和0.5ml S-9混合物(不加S-9混合物的则加0.5ml磷酸缓冲液),均匀后,迅速倒入底层培养基平板表面成一薄层(以上步骤需20秒内完成)。用已知致癌物作阳性对照,不加受试物为空白对照。37℃培养48小时后,计算平皿内出现的回变菌落数。

试验结果

受试物按不同溶剂,不同浓度,分别用点试法和掺入法测定,观察其诱变活性,结果见表1、2。

表1 受试物点试测定的诱变性

样 品	诱 变 性			
	TA ₉₈		TA ₁₀₀	
	加入 S-9 激活系统	未加 S-9 激活系统	加入 S-9 激活系统	未加 S-9 激活系统
丙酮抽提物 (1:5×10 ² 稀释)	-	-	-	-
乙醇抽提物 (1:5×10 ² 稀释)	-	-	-	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ³ 稀释)	-	-	-	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁴ 稀释)	-	-	-	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁵ 稀释)	-	-	-	-
MNNG (100μg/ml)			+	+
2-AF (2.5mg/ml)	+	-	+	

表2 受试物掺入法测定的诱变性

样 品	回 变 菌 落 数 (个/皿)				诱 变 性
	TA ₉₈		TA ₁₀₀		
	加入 S-9 激活系统	未加 S-9 激活系统	加入 S-9 激活系统	未加 S-9 激活系统	
乙醇抽提物 (1:5×10 ² 稀释)	20	30	23	28	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ³ 稀释)	16±1	13±1	15±1	12	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁴ 稀释)	15	15±1	25	14	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁵ 稀释)	19±1	17±1	15±1	15	-
空 白	17±1	16	25±1	18	-
2-AF (2.5 mg/ml)	>1000	27	277	46	+
乙醇抽提物 (1:2×10 ³ 稀释)*	23±1	21	86	101	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁴ 稀释)*	19±1	22	82	116	-
乙醇抽提物 (1:2×10 ⁵ 稀释)*	30±1	13±1	78±1	75	-
空 白*	30	19	112±1	117	-
2-AF (2.5 mg/ml)*	956	69	433	63	+

* 用自发回变率较高的测定菌检测的结果

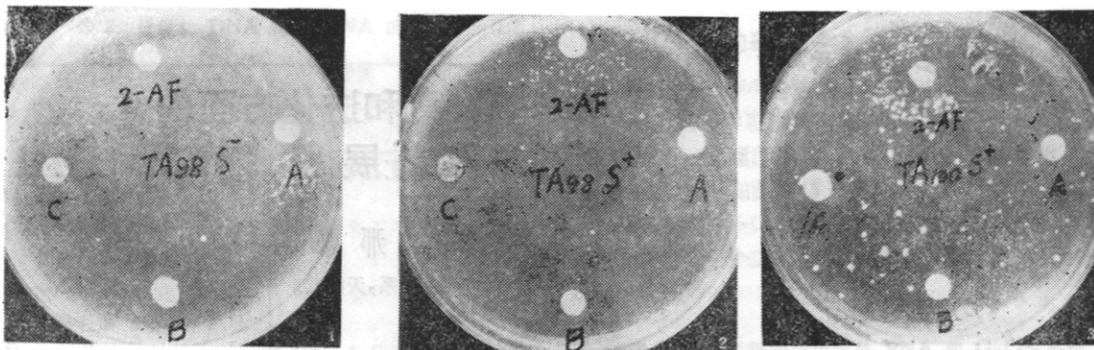


图1 不同浓度的抽提物点试测定结果

1. TA₉₈ 未加 S-9 激活系统
乙醇抽提物: A(1:2×10³ 稀释)、B(1:2×10⁴ 稀释)、C(1:2×10⁵ 稀释), 2-AF(2-氨基芴 2.5 mg/ml)。
2. TA₉₈ 加入 S-9 激活系统
3. TA₁₀₀ 加入 S-9 激活系统

由表 1 结果可见, 灭蚊链霉菌菌粉经乙醇或丙酮处理后, 作试点测定, 结果在滤纸片周围均未发现回变菌落数的明显增加, 而在对照(MNNG 和 2-AF) 的滤纸片周围, 则出现密集的回变菌落(见图 1)。从表 2 的结果发现, 抽提物的受试浓度, 不论是采用有效的田间使用浓度, 还是大于或小于这种浓度, 用自发回变率较低或较高的测定菌进行检测, 其回变菌落数均未超过自发回变菌落数的二倍以上, 因此, 可认为在上述试验条件下, 该制剂无诱变活性。

讨 论

1. 用微生物诱变试验法对致癌物的筛选, 具有快速、经济和预测效果好等优点。本试验采用的测定菌 TA₉₈、TA₁₀₀, 是通过将抗转移因子(R-因子)质粒 PKM₁₀₁ 传递给 TA₁₅₃₈ 与 TA₁₅₃₅ 得到的两个新菌株。它除具有旧标准测定菌株的特性外, 还有 R-因子菌株的特性,

因此, 一些用旧菌株检查不出的致癌物或对一些检查为弱阳性的致癌物, 用新菌株可以有效地检查出来或比较敏感。

2. 因灭蚊链霉菌制剂的性质、结构等还有待研究, 故其致突变活性的判断, 本试验只按与标准样品作比较和按受试样品的回变菌落数来定, 若超过自发回变菌落数二倍以上, 即定为阳性结果, 未超过的则定为阴性结果。

3. 灭蚊链霉菌制剂曾对猪、牛、鸭、猴子、鱼进行急性和对小白鼠进行急性、亚急性、慢性毒性试验, 结果除鱼类敏感外, 其它动物均未显示中毒现象。现用微生物诱变试验法进行致癌活性检测, 经 6 批点试法和 8 批掺入法的试验结果, 亦无诱变活性。因此, 该制剂除在鱼塘上游的流动水沟中大量施用外, 对人畜是较安全的。

参 考 文 献

- [1] 刘南欣等: 微生物学报, 19(1): 27-33, 1979。
[2] Ames. B. N. et al.: Mutation Res. 31: 347, 1975。