

抑菌试验用于测定 T-2 毒素

周与良 王红梅 张 军 周雨霞 李 健

(南开大学生物系, 天津)

摘要 本文从镰刀菌中提取 T-2 毒素,对不同的酵母菌进行抑菌试验,结果证明红酵母属 (*Rhodotorula*) 的三个种,即红酵母 (*R. glutinis*)、深红酵母 (*R. ruber*) 和小红酵母 (*R. minuta*) 对 T-2 毒素最敏感,被定为测毒敏感菌。将抑菌试验与家兔皮肤反应试验、豌豆发芽抑制试验进行对比,结果有部分重合,但不能相互取代。由于抑菌试验具有快速、简便、准确的优点,可做为测定 T-2 毒素的方法之一。

关键词 抑菌试验;T-2 毒素;红酵母 (*Rhodotorula*)

镰刀菌属 (*Fusarium*) 是一类危害田间麦类、玉米和库贮谷物的致病真菌,病粒产生毒素引起人畜镰刀菌毒素中毒。镰刀菌产生的毒素按其化学结构及其对动物的毒性大体可以分为:单端孢霉烯族化合物、玉米赤霉烯酮、丁烯酸内酯和串珠镰刀菌素四类^[1], 主要的是单端孢霉烯族化合物,其中 T-2 毒素的毒性最强^[2]。Burmeister^[3]曾指出,利用敏感微生物的抑菌试验是检测 T-2 毒素快速、简便的方法,并认为 T-2 毒素主要抑制酵母菌的生长而不抑制细菌的生长,我们的工作也曾证实了这个结论。目前国内对毒素的生物学测定通常主要采用豌豆发芽抑制试验和家兔皮肤反应试验等方法^[4,5,6], 尚未见抑菌试验用于毒素的生物学测定的报告。本文主要报道从不同种类的酵母菌中筛选测毒敏感菌及利用敏感菌的抑菌试验测定 T-2 毒素方面的工作,并将抑菌试验的测毒结果与

豌豆发芽抑制试验和家兔皮肤反应试验的结果进行比较。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和培养基

1. 菌株:部分为本系微生物教研室保存的菌种,部分购自中国科学院微生物研究所。
2. 培养基:培养酵母菌用葡萄糖-酵母膏-蛋白胨培养基;产毒培养用玉米碎粒(含水量 40%)。

(二) 产毒培养与毒素制备、豌豆发芽抑制试验和家兔皮肤反应试验

主要参照匡开源等的方法^[5]。

(三) 抑菌试验

在 Burmeister 等人^[3]方法的基础上稍作改动,先在培养皿内倒一薄层固体培养基,再倒一层混有敏感菌的半固体培养基,将溶有毒素

的丙酮溶液加到滤纸片上 ($\phi = 0.5\text{cm}$), 加热 70°C 左右待丙酮挥发后, 将滤纸片置于培养基表面, 温箱培养 (28°C) 1—3 天, 观察是否有抑菌圈形成, 并测其直径。

结果和讨论

(一) 不同的酵母菌对 T-2 毒素敏感性的比较(表 1)

从表 1 可见, 9 种不同的酵母菌对不同产毒菌株所产毒素的敏感性不同, 对同一产毒株所产毒素的敏感性也不同。例如, NKF-15 产的毒素对 9 株中的 2 株 (热带假丝酵母和汉逊德巴利氏酵母) 无抑菌作用, 对其它 7 株均有不同程度的抑菌作用。其中 3 种红酵母 (即红酵母、小红酵母、深红酵母) 最敏感。红酵母可以检出 6 个产毒株中的 5 株。小红酵母可以检出 2 株。深红酵母虽与其它酵母一样只能检出毒性较强的 NKF-15, 但抑菌圈较大。其余 4 种酵母的敏感性不及测试的 3 种红酵母, 故选这 3 种红酵母作为测毒敏感菌。

(二) 抑菌试验与豌豆发芽抑制试验、家兔皮肤反应试验结果的比较(表 2)

在表 2 中综合了抑菌试验、家兔皮肤反应

试验和豌豆发芽抑制试验三项检测方法对 28 株镰刀菌所产的 T-2 毒素的检测结果。可归纳为以下三种情况: (1) 三项检测结果一致。如 NKF-6、NKF-15、NKF-17、NKF-18 及无毒株的检测结果, 说明这三种方法对毒性较弱的和无毒的样品的检测是一致、可靠的。(2) 三项检测结果中仅一项为正反应, 其余两项为负反应, 如 NKF-3、NKF-4、NKF-8、NKF-13、NKF-14 和 NKF-19。这可能是由于对不同菌株产的毒素, 一种检测方法比另一种更敏感的缘故。在我们筛选无毒株的过程中, 这些菌株均被视为有毒株而被淘汰。(3) 家兔皮肤反应试验和豌豆发芽抑制试验为正反应而抑菌试验为负反应, 如 NKF-1、NKF-2、NKF-21、NKF-23 和 NKF-26。这表明, 抑菌试验在某些情况下对毒素的敏感性不及其它两项试验。

我们之所以推荐抑菌试验作为检测毒素的方法之一, 是因为抑菌试验有它独特的优点。它可以弥补其它两项检测方法的不足。如家兔皮肤反应试验受家兔个体之间差异影响较大, 同一毒素样品在 2 只家兔皮肤上反应结果就可能不同, 如 NKF-2、NKF-3、NKF-4、NKF-17、NKF-18、NKF-23 和 NKF-26。这样就

表 1 毒素对不同酵母菌的抑菌作用

产毒菌株	抑菌情况							T ₂
	NKF-13	NKF-18	NKF-15	NKF-17	NKF-6	NKF-24	T ₂	
小红酵母 <i>Rhodotorula minuta</i>	0.7	-	1.3	-	-	-	-	+
深红酵母 <i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	3.0	-	-	-	-	+
克鲁弗酵母 <i>Saccharomyces kluyveri</i>	-	-	1.4	-	-	-	-	+
埃切毕赤酵母 <i>Pichia etchellsii</i>	-	-	0.7	-	-	-	-	+
红酵母 <i>Rhodotorula glutinis</i>	-	0.8	4.0	1.1	0.8	0.7	-	+
大型隐球酵母 <i>Cryptococcus magnus</i>	-	-	1.0	-	-	-	-	+
热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
汉逊德巴利氏酵母 <i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
白色球拟酵母 <i>Torulopsis candida</i>	-	-	0.8	-	-	-	-	+

表2 酵母抑菌试验与豌豆发芽抑制试验,家兔皮肤反应试验结果的比较

产毒菌株	试验结果	测毒试验			家兔皮肤反应试验	豌豆发芽抑制试验(%)
		小红酵母	红酵母	深红酵母		
空白		-	-	-	-/-	100.0
NKF-1		-	-	-	+/-	8.6
NKF-2		-	-	-	+/-	63.8
NKF-3		-	-	-	+/+	94.8
NKF-4		-	-	-	+/+	96.6
NKF-5		-	-	-	-/-	98.3
NKF-6		-	0.8	-	+/+	51.7
NKF-7		-	-	-	-/-	100.0
NKF-8		-	-	-	-/-	57.0
NKF-9		-	-	-	-/-	98.3
NKF-10		-	-	-	-/-	93.3
NKF-11		-	-	-	-/-	100.0
NKF-12		-	-	-	-/-	91.4
NKF-13		0.7	-	-	+/-	96.6
NKF-14		-	-	-	-/-	51.7
NKF-15		1.3	4.0	3.0	+++	8.6
NKF-16		-	-	-	-/-	100.0
NKF-17		-	1.1	-	+/-	79.3
NKF-18		-	0.8	-	+/+	41.4
NKF-19		-	-	-	-/-	70.7
NKF-20		-	-	-	-/-	98.3
NKF-21		-	-	-	+/+	15.5
NKF-22		-	-	-	-/-	94.8
NKF-23		-	-	-	+/+	75.9
NKF-24		-	-	-	-/-	98.3
NKF-25		-	-	-	-/-	94.8
NKF-26		-	-	-	+/+	17.2
NKF-27		-	-	-	-/-	96.6
NKF-28		-	-	-	-/-	94.8

直接影响到试验结果的可靠性。豌豆发芽抑制试验的结果与豌豆的质量关系很大,只有用非常新鲜饱满的豌豆才能得到理想的结果。而抑菌试验中测毒所用的敏感物是微生物菌体,它们易于培养,生长快,样品是否有抑菌作用及抑菌圈的大小便于观察,且重复性好,因此不失为一个检测毒素的好方法。它可与豌豆发芽抑制试验和家兔皮肤反应试验共同使用,互相补充。尤其是从大量样品中筛选无毒株时,可先用抑菌试验淘汰有毒株,再用其它两个方法进一步检测。这样不但可以节省时间,减轻工作量,而

且可以反映出毒素对动物、植物、微生物作用的综合效应。

参 考 文 献

1. 孟昭赫: 国外医学参考资料(卫生学分册), 2: 80-89, 1975.
2. Ronald, C. S.: Mycotoxins and N-Nitroso compound; enviromental risks, vol. II, p. 40, 1981.
3. Burmeister et al: Applied Microbiology, 20(3): 437-440, 1970.
4. 吴经纶等: 微生物学报, 21(3): 344-349, 1981.
5. 匡开源等: 真菌学报, 4(3): 193-196, 1985.
6. 匡开源等: 微生物学通报, 16(1): 1-2, 1989.