

一株啮虫脒降解菌 AC04 的鼠类急性毒性评价

王旭, 张同刚, 郭进, 龚媛, 廖若宇, 徐梦霞, 刘雨杨, 曲云卿, 刘敦华*
(宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘要: **目的** 对从长期种植枸杞的土壤中分离筛选出一株可高效降解农药啮虫脒的细菌 AC04 进行急性毒性的安全性评价。**方法** 将提取的 AC04 菌液对小鼠进行经口灌胃急性毒性实验; 将表面喷洒菌悬液的枸杞对大鼠进行 30 d 喂养实验。**结果** 经口急性毒性实验中实验小鼠行为、进食均正常, 未出现中毒及死亡情况。观察期结束后, 解剖动物主要脏器、器官, 均未见明显异常改变。大鼠 30d 喂养实验中, 实验动物的体征外观、行为、体重、血象等各项指标均正常, 无明显中毒症状或不良反应。**结论** 该菌株及其代谢产物对试验鼠未见明显毒性。

关键词: 微生物降解; 啮虫脒; 急性毒性; 安全性评价

Acute toxicity evaluation of a strain of bacteria AC04 in rodent models

WANG Xu, ZHANG Tong-Gang, GUO Jin, GONG Yuan, LIAO Ruo-Yu, XU Meng-Xia,
LIU Yu-Yang, QU Yun-Qing, LIU Dun-Hua*

(College of Agricultural, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate a new screened strain of bacteria AC04 found in the soil of long-term planting of Chinese wolfberry which can efficiently degrade the pesticide acetamiprid using rodent acute toxicity models. **Methods** The extracted fluid of bacteria was given to mice for acute toxicity experiment by ig. The rats were fed with wolfberry sprayed by the bacterial suspension for 30 d. **Results** The acute oral toxicity tests showed the tested mice behaving and eating normal, without poisoning and death. At the end of the observation, the mice were dissected and the major organs showed no abnormalities. In the experiments of rats fed for 30 d, the appearance of experimental rats, as well as the behavior, body weight, and blood indicators showed normal, without obvious symptoms or adverse reactions. **Conclusion** The research showed that this strain of bacteria was harmless to the experimental animals.

KEY WORDS: microbial degradation; acetamiprid; acute toxicity; safety evaluation

1 引言

啮虫脒(acetamiprid), 化学名为 N'-[(6-氯-3-吡啶)甲基]-N'-氨基-N-甲基乙脒, 又称莫比朗、吡虫清、乙虫脒等, 分子式为 $C_{10}H_{11}ClN_4$, 相对分子质量为 222.68^[1-3]。啮虫脒是一种正被广泛使用的比较新的类

烟碱杀虫剂^[4], 是继吡虫啉后又一种氯代烟碱类杀虫剂, 对半翅目(蚜虫、叶蝉、蚱虫等)、鳞翅目(小菜蛾、潜叶蛾、纵卷叶螟)、鞘翅目(天牛、猿叶虫等)、缨翅目(蓟马类)昆虫均有效^[5-7]。

作为一种新型杀虫剂, 国内仅是对其合成工艺、杀虫效果及制剂的含量测定有所报道^[8-10], 国外则侧

通讯作者: 刘敦华, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: dunhualiu@126.com

*Corresponding author: LIU Dun-Hua, Doctor, Professor, College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China. E-mail: dunhualiu@126.com

重于其杀虫机理的研究^[11-13]。有报道^[14]称啮虫脘对水蚤极毒, 对鱼类高毒, 对藻类低毒, 但是啮虫脘施用后的残留、降解方法及毒性评价国内外罕见报道。

本研究从长期种植枸杞的土壤中分离出一株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 对农药啮虫脘的降解率达到 81%。菌株的胞外产物若要想得到进一步的应用, 毒性实验是不能缺少的。同时, 由于某些芽孢杆菌是条件致病菌, 为了确保其安全性, 有必要对其进行毒理学评价。本实验以从长期种植枸杞的土壤中分离出的芽孢杆菌的活菌悬液作为实验材料, 对小鼠进行经口灌胃染毒实验, 皮肤刺激实验, 大鼠 30 d 喂养实验, 观察动物给药后所产生的毒性症状及程度、出现和消失的时间、死亡发生率等, 为进一步的毒理学及应用研究提供依据。

2 实验材料与方法

2.1 受试动物与环境

清洁级昆明种小鼠 80 只, 四周龄, 体重(18±2) g, 雌雄各半; 清洁级大鼠 80 只, 四周龄, 体重(75±2) g, 实验动物均由宁夏医科大学医学动物实验中心提供。

动物饲养条件: 单笼饲养, 饲养温度与湿度: 室温 20 °C~25 °C, 相对湿度 50%~60%, 动物自由摄食和饮水。饲养方法为单笼喂养。

2.2 受试样品

菌体的制备: 取发酵原液经 3000 r/min 离心 20 min, 将上清液及菌体沉淀分离。菌体沉淀用发酵原液 1/10 体积的无菌水重新悬浮, 混匀, 制成菌悬液, 再配制成不同浓度梯度作为菌体受试物。

2.3 主要试剂及仪器

标准小牛血清(郑州益康生物工程有限公司); 甘油(广州市翔翔化工有限公司); 伊红(分析纯二级, 北京市化学试剂厂); 甲醇(分析纯, 天津市盛奥化学试剂有限公司); Giemsa 染液(上海试剂三厂); 磷酸二氢钠(分析纯; 济南龙江化工有限公司); 磷酸二氢钾(分析纯; 徐州弘安精细化工有限公司); 试剂盒(威特曼生物科技南京有限公司); 环磷酰胺(武汉银河化工有限公司)

超净工作台(AIRTECH 型, 苏净集团安泰公司制造); 显微镜(SM2 16001600x 36XC 型, 上海沪钰电子科技有限公司); 全自动生化分析仪(MOL-300 型,

上海艾诺电子有限公司); 全自动血球计数仪(SYSmesXT-1800i 型, 日本希思曼公司)

2.4 实验方法

依据 GB 15670-1995《农药登记毒理学试验方法》中相关标准进行实验^[15]。

2.4.1 剂量设置

菌悬液的制备: 发酵液经离心之后得到菌体沉淀, 用无菌水洗涤 2 次, 用平板计数法, 计算出原始菌数, 依次倍比稀释, 配制成含活菌数为五个剂量组 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 个/mL。

经口毒性实验中, 按照 0.1 mL/10 g 体重经口灌胃(ig)给予受试物。

大鼠 30 d 喂养实验中每组给予相同体积(均为 10 mL/kg), 三组受试物分为低剂量(20 mg/kg·bw)组、中剂量(活菌数含量为 1.032×10^8)组和高剂量(活菌数含量为 1.032×10^9)组。

2.4.2 经口急性毒性实验方法

实验前确定实验 32 只小鼠均健康, 隔夜禁食 16 h, 不限制饮水。按照 0.1 mL/10 g 体重经口灌胃给予受试物。对照组灌给同容积的生理盐水密切注意观察 2 h, 看是否有急性毒性发作, 记录动物中毒症状及死亡情况。然后恢复常规饮食, 连续观察 7 d。观察一下各项指标: 行为活动、神经系统反应、皮肤颜色、呼吸状态、体重变化等。

2.4.3 大鼠 30 d 喂养实验方法

清洁级大鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 75 g 左右, 随机分为 4 组, 对照组给予蒸馏水, 其余组给予受试物。每组给予相同体积(均为 10 mL/kg), 三组受试物(菌悬液)中所含活菌数不同, 分为低剂量(活菌数含量为 1.032×10^7)组、中剂量(活菌数含量为 1.032×10^8)组和高剂量(活菌数含量为 1.032×10^9)组。饲喂前将菌悬液分别喷洒于枸杞表面, 无菌环境下静置 24 h 待用。大鼠单笼饲养, 根据本实验剂量设计要求动物饲料摄入情况, 分别将喷有菌悬液的枸杞掺入 4 kg 饲料内, 搅拌均匀后经饲料机制成颗粒饲料, 分别给三组动物喂饲, 空白对照组给予不含样品的同种饲料, 并自由摄食饮水, 实验期间, 每周称重 1 次, 记录重量, 观察大鼠行为症状, 连续观察 30 d。喂养实验末期, 禁食 12 h 眼球取血, 断头处死, 心脏采血进行血象和血液生化学检查; 称量肝、肾、脾及睾丸的重量, 计算脏体比, 并进行组织病理学检查。

3 结果与分析

3.1 经口急性毒性实验结果

将菌悬液一次经口灌胃给予小鼠后,在观察期内小鼠活动、呼吸、进食、行为等均正常,无明显的中毒症状或不良反应,无小鼠死亡。将全部动物处死,解剖,肉眼检查心、肝、肾、肺、脾等主要脏器未见明显异常改变。急性毒性实验给予受试物最大剂量下动物无死亡,表明该菌悬液无急性致毒性,该菌制剂属于实际无毒。具体见表1。

表1 菌悬液的小鼠急性毒性实验结果
Table 1 The acute toxicity testing results of bacterial suspension

剂量(mg/kg·bw)	动物数(只)	动物出现中毒症状	动物死亡情况
0	8	无中毒	无死亡
20	8	无中毒	无死亡
40	8	无中毒	无死亡
60	8	无中毒	无死亡
80	8	无中毒	无死亡

3.2 大鼠30 d 喂养实验结果

3.2.1 大鼠体征外观、行为及体重的变化

(1) 体征外观 大鼠食用含菌菌制剂饲料30 d后,口周鼻及尾部粘膜无溃疡,呼吸平稳,背毛光泽、眼睛红亮、生长发育情况一切正常。

(2) 行为 服用菌液30 d后,大鼠活动正常,摄食、饮水、呼吸、大小便均未见异常,亦未观察到受试大鼠明显异常的行为和中毒症状。

(3) 体重 大鼠服用菌悬液30 d后,体重变化如表2。

由表2可以看出,大鼠连续食用含菌悬液的枸杞

30 d,各剂量组大鼠体重在不断变化,每周体重较前一周均有所增长,呈现正常增长趋势,组内自身对照各时段的体重差异具有统计学意义;组间对照,即高、中、低三个剂量组与正常对照组相比各时段体重增长均无明显差异($P > 0.05$)。

3.2.2 血象指标

采集血清时,将一部分血液盛于加抗凝剂的玻璃管中,另一部分置于无抗凝剂玻璃管中待用。取抗凝血于血液分析仪中测定实验末期的常规血液学指标:红细胞、血红蛋白、白细胞,结果见表3。

由表3可以看出,菌悬液活菌数含量高、中、低三组小鼠血液学指标与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$),表明各剂量组对小鼠的血象指标无明显影响。

因为血液中的红细胞、血红蛋白和白细胞与血浆是组成机体功能调节及新陈代谢所不可或缺的血液循环系统,血液中的任何指标成分发生病理变化,都会影响到全身的组织器官。因此通过对大鼠血液中的红细胞、血红蛋白和白细胞的三项指标进行分析,能够了解机体的健康状况。上述实验结果测得血象指标正常,说明该菌悬液未引起大鼠组织性或器官性的变化。

3.2.3 血液生化学指标

将非抗凝血在5000 r/min的离心机中离心15 min,分离获得血清,于SYSmesXT-1800i全自动生化分析仪中检测谷草转氨酶、谷丙转氨酶、白蛋白、总蛋白、肌酐、总胆固醇、尿素氮、血糖、甘油三酯等生化指标,结果见表4。

由表4可以看出,大鼠末期生化指标所测各组动物的谷草转氨酶、谷丙转氨酶、总蛋白、白蛋白、肌酐、尿素氮、甘油三酯、总胆固醇、血糖等指标与对照组均无显著性差异($P > 0.05$),表明各剂量组菌制剂对小鼠的血液生化学指标均无明显影响。

表2 大鼠体重变化(g)
Table 2 The weight changes of rats (g)

	第0 d	第8 d	第16 d	第24 d	第30 d
对照组	77.34±0.87a	115.20±3.41a	142.75±4.28a	177.45±8.33a	206.28±10.23a
低剂量组	77.60±0.65a	116.00±3.42a	144.75±4.28a	178.34±8.76a	204.80±11.64a
中剂量组	77.47±1.21a	115.75±3.18a	142.37±5.01a	178.47±8.20a	204.95±11.75a
高剂量组	76.52±0.45a	114.85±3.35a	145.25±4.65a	178.57±8.75a	205.45±11.71a

注:“a, b”表示组间差异显著性,组间字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著,下同。

表 3 大鼠血液学指标测定结果
Table 3 The hematological parameters of rats

	大鼠数(只)	红细胞($\times 10^{12}/L$)	血红蛋白(g/L)	白细胞($\times 10^9/L$)
对照组	8	9.28 \pm 0.10a	167.64 \pm 8.50a	3.42 \pm 1.12a
低剂量组	8	9.26 \pm 0.14a	166.33 \pm 8.65a	3.43 \pm 1.09a
中剂量组	8	9.27 \pm 0.12a	167.48 \pm 8.31a	3.42 \pm 1.11a
高剂量组	8	9.30 \pm 0.10a	169.35 \pm 9.18a	3.40 \pm 1.10a

表 4 大鼠血液生化指标测定结果
Table 4 The blood biochemical index of rats

	大鼠(只)	谷丙转氨酶(U/L)	谷草转氨酶(U/L)	白蛋白(g/L)	总蛋白(g/L)	肌酐(μ mol/L)	尿素氮(mmol/L)	总胆固醇(mmol/L)	甘油三酯(mmol/L)	血糖(mmol/L)
对照组	8	82.20 \pm 1.79a	330.12 \pm 12.30a	32.66 \pm 1.96a	65.29 \pm 4.23a	65.42 \pm 9.43a	6.60 \pm 0.23a	2.10 \pm 0.19a	0.43 \pm 0.02a	6.20 \pm 0.54a
低剂量组	8	82.79 \pm 1.54a	325.47 \pm 11.93a	33.09 \pm 1.20a	64.27 \pm 4.91a	64.67 \pm 8.72a	6.64 \pm 0.56a	2.08 \pm 0.20a	0.43 \pm 0.01a	6.19 \pm 0.50a
中剂量组	8	83.46 \pm 1.97a	329.13 \pm 11.30a	31.78 \pm 1.52a	64.46 \pm 3.96a	64.59 \pm 8.68a	6.53 \pm 0.32a	2.09 \pm 0.22a	0.40 \pm 0.02a	6.20 \pm 0.51a
高剂量组	8	83.80 \pm 2.05a	328.45 \pm 11.45a	33.44 \pm 1.15a	65.74 \pm 4.45a	66.10 \pm 7.30a	6.50 \pm 0.36a	2.12 \pm 0.19a	0.42 \pm 0.03a	6.18 \pm 0.49a

表 5 大鼠主要脏器重量测定结果
Table 5 The weight of main organs of rats

	大鼠(只)	体重量(g)	肝脏重量(g)	脾脏重量(g)	肾脏重量(g)	睾丸重量(g)
对照组	8	218.70 \pm 19.28a	8.17 \pm 1.41a	0.34 \pm 0.35a	1.75 \pm 0.08a	2.85 \pm 0.40a
低剂量组	8	221.83 \pm 18.52a	8.05 \pm 1.69a	0.31 \pm 0.36a	1.74 \pm 0.09a	2.90 \pm 0.39a
中剂量组	8	220.65 \pm 20.99a	8.31 \pm 1.72a	0.33 \pm 0.41a	1.70 \pm 0.07a	2.81 \pm 0.41a
高剂量组	8	219.94 \pm 23.39a	8.29 \pm 1.84a	0.29 \pm 0.35a	1.69 \pm 0.10a	2.79 \pm 0.39a

注: “睾丸重量”为 4 只雄性大鼠的平均值。

表 6 大鼠主要脏器系数测定结果
Table 6 The index of main organs of rats

	大鼠(只)	肝重/体重(%)	脾重/体重(%)	肾重/体重(%)	睾丸/体重(%)
对照组	8	3.67 \pm 0.35a	0.15 \pm 0.03a	0.79 \pm 0.13a	1.25 \pm 0.09a
低剂量组	8	3.52 \pm 0.40a	0.14 \pm 0.05a	0.80 \pm 0.10a	1.30 \pm 0.08a
中剂量组	8	3.80 \pm 0.33a	0.15 \pm 0.04a	0.80 \pm 0.15a	1.41 \pm 0.10a
高剂量组	8	3.43 \pm 0.43a	0.16 \pm 0.03a	0.82 \pm 0.14a	1.29 \pm 0.09a

3.2.4 大鼠脏器重量及脏器比

大鼠解剖取血后, 将肝、脾、肾、睾丸迅速取出, 并剔除表面脂肪膜, 称重后置于洁净塑料袋中密封, 低温保存待测。称重后记录各组织器官重量, 计算肝重/体重、肾重/体重、脾重/体重及睾丸重/体重的脏器系数。

由表 5 大鼠脏器重量测定结果可知, 对照组及低、中、高三个剂量组的大鼠肝、脾、肾、睾丸均未发生异常。

由表 6 各实验组重要脏器系数(脏器湿重/体重 $\times 100$)结果可知, 各剂量组脏器系数与对照组比较无差异显著性($P > 0.05$)。

3.2.5 病理组织学检查

大鼠解剖时,观察脏器肝、胃、肾、脾、十二指肠、睾丸、卵巢的色泽、形态、位置均无异常,脏器间无粘连、脏器表面及消化管内膜无充血、瘀血、水肿、溃疡现象,其腹腔、胸腔与对照组相比未见肉眼可见的病理改变。

解剖后取出各脏器进一步观察,各剂量组大鼠肾、肝、脾脏、睾丸与对照组基本一致,外观淡紫红色,表面光泽油润,各脏器组织较正常结构均无明显异常改变。各剂量组动物脏器均未见由受试物引起的损害性改变或明显影响。

4 结论

(1) 由小鼠经口灌胃急性毒性实验可知,该菌悬液对小鼠急性经口最大耐受剂量大于高剂量组,给药期间小鼠无一死亡,外观、行为、呼吸、摄食、粪便均无异常。

(2) 大鼠 30 天喂养实验结果表明,实验期间各剂量组大鼠均未见异常症状和体征,也无死亡,大鼠体态健康、血液及血液生化指标也无异常变化,且结果均在正常范围内,大鼠病理组织检查结果大鼠解剖观察均未发现异常变化,表明该微生物喷洒于枸杞表面后其代谢物对大鼠无毒性。

(3) 前两阶段毒性实验结果均为阴性,因此初步判定该菌株及代谢产物对环境及小型哺乳动物无危害。对大型哺乳动物和人体的影响尚待进一步研究确定。

参考文献

- [1] 袁爱华. 臭氧降解水中啶虫脒的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
Yuan AH. Study on the degradation of acetamiprid in aqueous solution by ozonation [D]. Tai'an: Agricultural College of Shandong, 2014.
- [2] 姜艳艳. 介质阻挡低温等离子体降解水中啶虫脒的研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
Jiang YY. The study on the degradation of acetaprid in pesticide wastewater by the low-temperature plasma using dielectric barrier discharge [D]. Jinan: Shandong University, 2013.
- [3] 李广领, 王自良, 陈锡岭, 等. 新型氯化烟碱杀虫剂啶虫脒最新研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009, (5): 91-96.
Li GL, Wang ZL, Chen XL, Zhang SJ. The recent research advance of new chloronicotinyl insecticide-acetamiprid [J]. Hunan Agric Sci, 2009, (5): 91-96.
- [4] 姚晓华, 闵航, 袁海平. 啶虫脒污染下土壤微生物多样性[J]. 生态学报, 2006, 26(9): 3074-3080.
Yao XH, Min H, Yuan HP. Microbial diversity in an acetamiprid-polluted upland soil [J]. Acta Ecolo Sinica, 2006, 26(9): 3074-3080.
- [5] 姚晓华, 闵航, 袁海平. 杀虫剂啶虫脒对旱地土壤酶活性及呼吸强度的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(6): 1012-1016.
Yao XH, Min H, Yuan HP. Effects of acetamiprid on enzymatic activities and respiration of upland soil [J]. Acta Pedol Scinica, 2005, 42(6): 1012-1016.
- [6] 贾玮玮, 刘敦华. 降解枸杞农药残留菌株的分离鉴定[C]. 第三届国际食品安全高峰论坛, 2010: 147-150.
Jia WW, Liu DH. Isolation and Identification of pesticide degrading bacteria of residues in Lycium barbarum L [C]. The Third International Food Safety Forum, 2010: 147-150.
- [7] 苏婷. 茶叶中啶虫脒残留检测方法及其消解动态研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
Su T. Studies on determination method and degradation dynamic of acetamiprid residues in tea [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012.
- [8] 莫建初, 滕立, 刘文军, 等. 测试条件对啶虫脒毒土柱防白蚁效果的影响[J]. 农药学学报, 2003, 5(2): 53-58.
Mo JC, Teng L, Liu WJ, et al. Influences of test conditions on the effects of acetamiprid against *Reticulitermes flaviceps* [J]. Chin J Pesti Cide Sci, 2003, 5(2): 53-58.
- [9] 毕富春. 用 SE -30 大口径毛细管柱定量分析啶虫脒[J]. 农药, 2001, 40(10): 19-20.
Bi FC. Quantitative analysis of acetamiprid by a wide borecapillary column coated with SE-30 [J]. Agric Chem, 2001, 40(10): 19-20.
- [10] 周育, 庾琴, 侯慧峰, 等. 新型烟碱类杀虫剂啶虫脒研究进展[J]. 植物保护, 2006, 32(3): 16-20.
Zhou Y, Yu Q, Hou HF, et al. Progress in chloronicotinyl insecticide acetamiprid [J]. Plant Prot, 2006, 32(3): 16-20.
- [11] Takao I, Naoki M, Michael R, et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *apis mellifera* [J]. Crop Prot, 2004, 23: 371-378.
- [12] Li XY. Immunomodulating Chinese herbal medicines [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1991, 86 (2): 159-164.
- [13] Liu J, Liu Y, Klaassen CD. The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver injury in mice [J]. J Ethno-

pharm, 1994, 42(3): 183-191.

- [14] 胡双庆, 尹大强, 陈良燕. 吡虫清等 4 种新农药的水生态安全性评价[J]. 农村生态环境, 2002, 18(4): 23-26.

Hu S Q, Yin DQ, Chen LY. Safety evaluation of four new pesticides in aquatic ecosystem [J]. Rural Eco-Environ, 2002, 18(4): 23-26.

- [15] GB/T 15670-1995 农药登记毒理学试验方法[S].

GB/T 15670-1995 Toxicology test methods for pesticide registration [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 旭, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 271086754@qq.com



刘敦华, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学及食品质量与安全。

E-mail: dunhualiu@126.com