

The Security Study of Biocontrol Strain for Post-Harvest Diseases of Melon

Xu Cao, Jingyu Chen, Jihua Hu, Wei Jiang, Yushuai Liu, Liqiang Meng, Shumei Zhang, Jing Li*

Institute of Microbiology of Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin Heilongjiang
Email: *lj0706@sohu.com

Received: Dec. 2nd, 2016; accepted: Dec. 23rd, 2016; published: Dec. 26th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Aim: To study the security of biocontrol strain *Pseudomonas luteola* that has better control effect on post-harvest diseases of melon, and then provide effective and safe microbial resource for the development of microbial pesticide. **Methods:** By second lavage in mice with maximum concentration 3×10^9 cfu/mL and 0.4 mL/10 g maximum volume, to measure the LD₅₀ and maximum tolerated dose. **Results:** After having been observed for 21 days, 20 mice were in good condition and without no any discomfort; fur was light; activities and feeding were normal; no diarrhea occurred and there were no deaths. **Conclusion:** *Pseudomonas luteola* was safe for application as microbial pesticide.

Keywords

Pseudomonas luteola, Acute Toxicity, Security

薄皮甜瓜采后病害生防菌株的安全性研究

曹旭, 陈静宇, 胡基华, 姜威, 刘宇帅, 孟利强, 张淑梅, 李晶*

黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨
Email: *lj0706@sohu.com

收稿日期: 2016年12月2日; 录用日期: 2016年12月23日; 发布日期: 2016年12月26日

*通讯作者。

文章引用: 曹旭, 陈静宇, 胡基华, 姜威, 刘宇帅, 孟利强, 张淑梅, 李晶. 薄皮甜瓜采后病害生防菌株的安全性研究[J]. 微生物前沿, 2016, 5(4): 66-70. <http://dx.doi.org/10.12677/amb.2016.54007>

摘要

目的：研究对薄皮甜瓜采后病害具有防治作用的生防菌株浅黄假单胞菌的安全性，为微生物农药的开发提供安全的微生物资源。方法：将浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)以 3×10^9 cfu/mL的最大浓度、0.4 mL/10 g的最大体积，对小鼠二次灌胃给药，测定半数致死量和最大耐受量。结果：观察21 d，20只小鼠均状态良好，未出现任何不适现象，皮毛光亮、活动正常、摄食正常、无腹泻发生，无死亡病例。结论：该受试样品作为微生物农药使用是安全的。

关键词

浅黄假单胞菌，急性毒性，安全性

1. 引言

由于薄皮甜瓜的大面积集中种植，成熟期也相对集中，再加上其不耐储运的特点，采后病害发生严重，成为目前制约甜瓜经济效益的主要障碍，亟待研究解决[1]。而对甜瓜采后病害防治主要以化学农药为主，虽然防效高，但存在环境污染和残留严重的弊端，因此市场上急需绿色环保和高效的生物农药产品[2]。

20世纪80年代以来，生物防治作为一种控制果蔬采后病害的新途径逐渐被人们接受、重视，并成为研究的热点[3][4]。由于生物防腐不具有化学防腐保鲜带来的环境污染、农药残留及连续使用产生抗药性等缺点而将逐步取代化学杀菌剂，成为一种新的保鲜方法[5]。

笔者前期已筛选到一株具有防治薄皮甜瓜采后病害的生防菌株[6]，根据《微生物农药毒理学试验准则》[7][8]进行生防菌株浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)对小鼠的急性毒性试验，以确定其安全性。拟将生物防治技术这种极具前途的“绿色防腐”技术应用于薄皮甜瓜采后病害的防治中，为人们提供品质优良、绿色安全、可延长保存期的薄皮甜瓜。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

2.1.1. 药品

受试样品：浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)，由黑龙江省生物工程重点实验室自薄皮甜瓜表面分离。

发酵初始培养基：葡萄糖 20 g/L，MgSO₄ 0.2 g/L，牛肉膏 8.3 g/L，酵母膏 6.9 g/L，K₂HPO₄ 1 g/L，CaCO₃ 1 g/L，pH 7.2~7.5。湿热灭菌：121℃，20 min。

规格： 3×10^9 cfu/mL，菌剂使用浓度： 3×10^7 cfu/mL。

2.1.2. 动物

昆明种小鼠 20 只，清洁级，6~8 周龄，体重 20 ± 2 g，雌雄各半。

由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供，合格证号：SCXK(黑)2008004，发证单位为黑龙江省科技厅。

2.2. 试验方法

按照中华人民共和国农业行业标准 NY/T 2186.1-2012《微生物农药毒理学试验准则》中第一部分急

性经口毒性/致病性试验的有关要求进行试验。

2.2.1. 半数致死量测定

取体重 20 ± 2 g 昆明种小鼠 20 只, 每组 10 只, 雌雄各半。试验前禁食不禁水 12 h 后, 按 25 mL/kg 小鼠体重灌胃给药一次。根据小鼠死亡状况作适当调整, 分别找出浅黄假单胞菌的 LD_{100} (100% 死亡率)、 LD_0 (0% 死亡率) 和相应的剂量组间距 r 值, 进行 LD_{50} 值的测定。

2.2.2. 最大给药量试验

根据预试验结果, 试验样品内容物浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)以最大浓度 3×10^9 cfu/mL, 最大体积 0.4 mL/10 g 对小鼠进行二次灌胃给药, 无法测得浅黄假单胞菌的小鼠半数致死量(LD_{50}), 故进行最大给药量试验。

取体重 20 ± 2 g 昆明种小鼠 20 只, 每组 10 只, 雌雄各半。先在实验室饲养 2 日, 以适应实验室环境, 禁食不禁水 12 h 后, 以该药配制最大浓度 3×10^9 cfu/mL, 最大体积 0.4 mL/10 g, 间隔 6 h 二次给予各鼠口服灌胃, 药后 3 h 正常给食给水喂养, 观察 21 d 内小鼠有无行为活动异常及死亡, 各鼠皮毛、二便、饮食状态等有无异常改变, 并记录药后 7、14、21 d 内小鼠体重变化。

2.2.3. 观察方法

各组灌胃给药后, 正常饲养, 给药后 2 h 之内, 每 15 min 观察 1 次; 给药后 2~4 h 之内, 每 30 min 观察一次; 给药后 4~8 h 之内, 每 1 h 观察一次, 密切观察各小鼠的动度、进食、饮水情况及 21 d 内可能出现的动度、异常肌肉运动、对外反应、瞳孔改变、大小便异常、眼球凸出、眼睑下垂、呼吸异常、皮肤颜色改变等毒性反应和死亡情况。若有小鼠死亡, 即刻解剖, 肉眼观察其心、肝、脾、肺、肾脏器的改变, 21 d 观察期结束后, 将每组存活的小鼠处死进行解剖, 按上述同样方法对主要脏器大体病理变化进行肉眼观察。

3. 结果与分析

3.1. 半数致死量测定结果

在急性毒性试验中, 小鼠口服灌胃服用受试样品浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)菌体混悬液, 整个试验期均无动物死亡发生, 20 只小鼠全部存活, 未能测出 LD_{50} , 见表 1。

3.2. 最大给药量试验结果

3.2.1. 受试样品对小鼠一般体征的影响

如表 2 所示, 21 d 内小鼠行为活动正常, 无异常病理性神经反射出现, 进食正常, 毛发光洁、反应机敏、活动自如、未发现步态异常及震撼、痉挛等神经反应; 呼吸平稳, 无呕吐, 二便、饮食状态等均无异常改变。

3.2.2. 受试样品对小鼠体重的影响

如表 3 所示, 给药后第 7 d 小鼠体重增长为 6.2 g, 第 14 天小鼠体重增重为 7.7 g, 第 21 天小鼠体重增重为 5.3 g, 均在昆明小鼠体重增长的正常范围, 符合昆明小鼠体重正常增长规律。

3.2.3. 受试样品对小鼠的最大耐受量

如表 4 所示, 受试样品浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)最大耐受量为 1.2×10^{11} cfu/kg, 在此剂量时, 动物状态良好, 未出现任何不适现象, 皮毛光亮、活动正常、摄食正常、无腹泻发生, 无死亡例数, 体重增长在正常范围之内。

Table 1. The acute toxicity result of mouse given *Pseudomonas luteola* liquid by mouth**表 1.** 浅黄假单胞菌小鼠急性经口毒性试验结果

组别	性别	动物数(只)	死亡数(只)	LD ₅₀ (mg/kg)
浅黄假单胞菌组	♀	10	0	>15,000
	♂	10	0	>15,000

Table 2. The influence of *Pseudomonas luteola* on mouse physical sign**表 2.** 浅黄假单胞菌对小鼠一般体征的影响

编号	死亡	行走	摄水量	皮毛光泽	腹泻	其他
1~10	—	正常	正常	正常	—	—
11~20	—	正常	正常	正常	—	—

Table 3. The influence of *Pseudomonas luteola* on mouse weight**表 3.** 浅黄假单胞菌对小鼠体重的变化影响

编 号	体重/g			
	1d	7d	14d	21d
1	18.9	24.4	33.4	38.4
2	21.1	28.3	36.8	39.4
3	20.3	26.1	37.2	40.2
4	19.6	25.8	29.4	36.5
5	18.0	26.7	28.1	35.1
6	19.3	26.7	30.0	39.7
7	21.4	28.2	38.9	41.6
8	20.2	27.5	31.5	37.3
9	19.4	27.8	36.0	40.8
10	17.9	29.7	36.9	43.7
11	20.4	26.8	32.4	39.8
12	19.7	24.4	28.8	34.1
13	18.5	23.8	33.1	38.9
14	19.9	24.1	39.2	43.5
15	21.4	25.4	29.9	37.4
16	22.4	25.1	35.2	38.8
17	19.5	23.7	38.7	41.0
18	22.5	26.9	32.5	37.9
19	20.3	29.4	38.3	44.0
20	22.9	27.5	36.1	39.1
均值	20.2 ± 1.39 a	26.4 ± 1.76 b	34.1 ± 3.58 c	39.4 ± 2.59 d

注: *P < 0.05。

Table 4. The mouse maximum dosage result of *Pseudomonas luteola***表 4.** 浅黄假单胞菌小鼠最大给药量测定结果

动物数	给药浓度	给药体积	给药次数	最大剂量	观察时间	死亡数
(n)	(cfu/mL)	(mL/kg)	(次/d)	(cfu/kg)	(d)	(只)
20	3×10^9	40	2	1.2×10^{11}	21	0

3.2.4. 受试样品对小鼠主要脏器的影响

对所有受试小鼠进行大体解剖, 未见其组织器官出现颜色、体积和质地等改变。受试样品组小鼠皮肤、粘膜、眼睛、呼吸、循环及中枢神经系统、行为表现等反应与阴性对照组小鼠无明显差别。

4. 结论与讨论

受试样品浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)以 3×10^9 cfu/mL 最大浓度, 最大体积 0.4 mL/10 g, 二次灌胃给药, 观察 21 d, 20 只小鼠均状态良好, 未出现任何不适现象, 皮毛光亮、活动正常、摄食正常、无腹泻发生, 无死亡病例, 结果可以表明浅黄假单胞菌作为微生物农药使用相当安全。2009 年李晶等将枯草芽孢杆菌菌剂(3.5×10^9 cfu/mL)对大鼠一次性灌胃给药, 结果各剂量组动物均无明显中毒表现, 无死亡发生, LD₅₀ 值 大于 5000 mg/kg [9]。按照我国农药急性毒性分级标准, 浅黄假单胞菌和枯草芽孢杆菌均属微毒类, 可以作为微生物农药推广应用。

采用生物防治将是今后果蔬防腐保鲜技术的发展方向。本研究将为今后研究拥有自主知识产权、高防效、定殖快、繁殖力强、高产稳产的生防菌株及一套薄皮甜瓜采后病害生防应用技术提供基础; 不仅对果蔬采后病害的生物防控提供技术保障, 也对绿色安全食品工程发展起推动作用, 同时能够有效的减少化学农药使用量, 且对环境具有保护作用。

基金项目

哈尔滨市优秀学科带头人项目(2014RFXJ088)。

参考文献 (References)

- [1] 刘君璞, 许勇, 孙小武, 等. 我国西瓜甜瓜产业“十一五”的展望及建议[J]. 中国瓜菜, 2006(1): 1-3.
- [2] Huang, Y., Deverall, B.J., Tang, W.H., et al. (2000) Foliar Application of Acibenzolar-S-Methyl and Protection of Postharvest Rock Melons and Hamimelons from Disease. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 651-656. <https://doi.org/10.1023/A:1008767719691>
- [3] Wang, W., Tang, W.H., Hang, Y., et al. (2000) Investigation and Biological Control of Postharvest Diseases of Muskmelon. Quality Assurance in Agriculture Produce. *ACIAR Proceedings*, Canberra, **100**, 582-585.
- [4] 葛永红. “银帝”甜瓜主要采后病害的潜伏侵染及抗病性诱导[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2004.
- [5] Wisniewski, M.E. and Wilson, C.L. (1992) Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Recent Advance. *HortScience*, **27**, 94-98.
- [6] 曹旭, 李晶, 等. 薄皮甜瓜采后病害生防菌株的筛选及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(12): 3552-3554.
- [7] 卫生部职业卫生标准专业委员会. GBZ/T240.2-2011 微生物农药毒理学试验准则[S]. 北京: 标准出版社, 2012.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [9] 李晶, 杨谦, 张淑梅, 王玉霞, 赵晓宇. 枯草芽孢杆菌 B29 菌株防治黄瓜枯萎病的田间效果及安全性评价初报[J]. 中国蔬菜, 2009(2): 30-33.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org