

商陆根际真菌 *Aspergillus fumigatus* SL-30 杀螺有效成分 MI 的生物安全性

郭丹钊, 陈钧*

【摘要】 目的 了解商陆 (*Phytolacca acinosa*) 根际真菌 *Aspergillus fumigatus* SL-30 杀螺有效成分硫代二酮哌嗪类化合物 (MI) 的生物安全性。方法 将 MI 用去氯水配制成 0.01 至 0.60 mg/L 等一系列浓度, 采用浸杀法测定 MI 杀灭钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 活性, 分别于 24、48 和 72 h 统计各组钉螺死亡率并计算半数致死浓度 (LC_{50}); 采用半静态法测定 0.5~4.0 mg/L 等一系列浓度 MI 对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)、河虾 (*Macrobrachium nipponensis*) 和泽蛙 (*Rana limnochrus*) 蝌蚪的急性毒性, 于 24、48 和 72 h 观察实验动物的反应并统计死亡情况; 采用自然土壤法测定 1 mg/kg 和 10 mg/kg MI 对蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 的影响, 于第 7 和 14 天各观察 1 次, 统计各处理组蚯蚓的死亡和中毒情况; 采用密闭碱液直接吸收法测定 10 mg/kg MI 对土壤微生物的影响, 分别于第 2、5、7、10、12 和 15 d 测定并计算每 100 g 干土的 CO_2 释放量。结果 24、48 和 72 h MI 杀灭钉螺的 LC_{50} 分别为 0.101、0.062 和 0.022 mg/L; 斑马鱼、河虾和泽蛙蝌蚪的死亡率均随药物浓度升高而增高, 各实验动物 24、48 和 72 h 的 LC_{50} 值分别为 1.941、1.755 和 1.219 mg/L (斑马鱼), 3.170、2.720 和 2.419 mg/L (河虾), 2.109、1.751 和 1.288 mg/L (泽蛙蝌蚪)。MI 对蚯蚓的 LC_{50} > 10.0 mg/kg。MI 为 10 mg/kg 时, 15 d 内对微生物呼吸的抑制率均低于 50%。结论 MI 对斑马鱼、河虾和泽蛙蝌蚪的毒性远低于对钉螺的毒性, 在有效杀螺浓度范围内, MI 对供试水生非靶生物是安全的; MI 对蚯蚓和土壤微生物属低毒级。

【关键词】 硫代二酮哌嗪类化合物; 钉螺; 非靶生物

中图分类号: R383.241 文献标识码: A

Biological Safety of the Molluscicidal Ingredient from *Aspergillus fumigatus* SL-30 Isolated from Rhizosphere of *Phytolacca acinosa*

GUO Dan-zhao, CHEN Jun*

(School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

【Abstract】 **Objective** To study biological safety of the molluscicidal ingredient (MI, a kind of diketopiperazines) in the exocellular broth of *Aspergillus fumigatus* SL-30' which was isolated from the rhizosphere of *Phytolacca acinosa*. **Methods** The MI was prepared in concentrations ranging from 0.01 to 0.60 mg/L, at the same time molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* was tested by using immersion method, and the LC_{50} in the case of immersion time for 24, 48 and 72 h was calculated. Acute toxicity of the MI with concentration ranging from 0.5 to 4.0 mg/L on *Brachydanio rerio*, *Macrobrachium nipponensis* and *Rana limnochrus* was performed by standard laboratory procedure, and mortality rate of the tested animals with treated time of 24, 48 and 72 h was recorded. Effect of the MI on *Eisenia fetida* was tested using natural soil procedure with the dose of 1 and 10 mg/kg, and the poisoning performance and mortality in the 7th day and 14th day were recorded. Inhibition of the MI at 10 mg/kg on respiration of soil microorganisms was determined by sealed alkaline direct absorption method, and the released amount of CO_2 (mg/100 g) in the 2nd, 5th, 7th, 10th, 12th and 15th day was determined. **Results** Molluscicidal activity of the MI against *Oncomelania hupensis* was shown with LC_{50} 0.101, 0.062, and 0.022 mg/L in 24, 48 and 72 h, respectively. Mortality rate of *Brachydanio rerio*, *Macrobrachium nipponensis* and *Rana limnochrus* all increased with the increase of MI concentration, and the LC_{50} of each kind of tested animals was recorded as follows: 1.941, 1.755 and 1.219 mg/L for *Brachydanio rerio*, 3.170, 2.720 and 2.419 mg/L for *Macrobrachium nipponensis*, 2.109, 1.751 and 1.288 mg/L for *Rana limnochrus* in 24, 48 and 72 h, respectively. The LC_{50} of MI on *Eisenia fetida* was >10.0 mg/kg. The inhibition rate of MI was less than 50% with a concentration of 10 mg/kg in 15 days. **Conclusion** The MI shows molluscicidal activity on *Oncomelania hupensis* with much lower toxicity on *Brachydanio rerio*,

基金项目: 江苏大学高级专业人才培养启动基金项目 (NO. 12JDG078); 江苏省 2011 年度普通高校研究生科研创新计划项目 (No. CXZZ11_0587)

作者单位: 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江, 212013

* 通讯作者, E-mail: syxchenjun@126.com

Macrobrachium nipponensis and *Rana limnochriss*. The MI is safe to non-target aquatic organisms, and to both *Eisenia fetida* and soil microorganisms under the effective molluscicidal concentration.

【Key words】 Diketopiperazines; *Oncomelania hupensis*; Non-target organisms

Supported by Supported by Scientific Research Initial Fund from Jiangsu University for Senior Professionals (N.O. 12JG078), and Research and Innovation Project for Postgraduates of Higher Education Institutions of Jiangsu Province in 2011 (No. CXZZ11_0587)

* Corresponding author, E-mail: syxchenjun@126.com

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫的唯一中间宿主^[1], 杀灭钉螺是控制血吸虫病流行的重要环节。目前主要使用的化学灭螺药物均不同程度地存在选择性较弱、造成环境污染等问题^[2], 因此, 研发安全的天然产物来源的杀螺剂具有十分重要的现实意义。

本室从药用植物商陆 (*Phytolacca acinosa*) 的根际筛选到一株具有杀螺活性的菌株 *Aspergillus fumigatus* SL-30^[3], 并采用系统分离法结合杀螺活性跟踪, 分离纯化得到其胞外发酵液中的主要杀螺有效成分硫代二酮哌嗪类化合物 (molluscicidal ingredient, MI)^[4]。参照国家质量技术监督局的《农药登记毒理学试验方法》(GB 15670-1995) 和农药登记资料规定 (中华人民共和国农业部令 10 号), 并结合 MI 在生物防治过程中可能遇到的非靶生物, 本文检测了杀螺活性物质 MI 对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)、河虾 (*Macrobrachium nipponensis*)、泽蛙 (*Rana limnochriss*) 蝌蚪、蚯蚓和土壤中微生物的影响, 旨在初步评价其生物安全性, 为 MI 的进一步研究和开发应用提供实验依据。

材料与方法

1 材料

商陆根际真菌 *Aspergillus fumigatus* SL-30 杀螺有效成分 MI 由本室提取。钉螺采自江苏省镇江市京口区长江村长江江滩, 经鉴定系湖北钉螺指名亚种 (*Oncomelania hupensis*), 去氯水清洗后在实验室常温下适应性饲养 1~2 d, 挑选 6~7 旋的健康成年钉螺用于杀螺实验。斑马鱼购自镇江市花鸟鱼虫市场, 于 (23±2) °C 实验室内适应性饲养 2 d, 选择大小一致 (平均体长约 30 mm)、健康活跃的斑马鱼备用, 试验前 24 h 停止喂食。河虾采自江苏大学校园湖泊, 于 (23±2) °C 实验室内适应 7 d, 选择大小一致 (平均体长约 20 mm)、健康活跃的河虾备用, 试验前 24 h 停止喂食。泽蛙蝌蚪购自镇江市花鸟鱼虫市场, 选健康活泼的备用。赤子爱胜蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 购自镇江市花鸟鱼虫市场, 于 (23±2) °C 实验室内适应性饲养 2 d (平均体长约 30 mm), 选择环带明显且大小一致的健康成蚯备用。

2 主要试剂和仪器

氯硝柳胺 (niclosamide, 纯度为 98%) 由江苏省血吸虫病防治研究所惠赠。分析天平 (METTLER AE240) 为上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品, 超净工作台 (SW-CJ-2FD) 为苏州苏净集团产品, 恒温振荡培养摇床 (QYC-211) 为上海福玛试验设备有限公司产品。

3 MI 的杀螺活性测定

采用浸杀法测定杀螺活性: 将 MI 用去氯水配制成 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20、0.40 和 0.60 mg/L 等系列浓度的药液各 300 ml, 分别置烧杯中, 同时以氯硝柳胺 (1 mg/L) 和去氯水作为阳性对照和阴性对照。将钉螺装入尼龙网袋 (30 只/袋) 并扎紧袋口, 每只烧杯投放钉螺 1 袋。试验重复 3 次。分别浸泡 24、48 和 72 h 后, 弃去药液, 用去氯水清洗钉螺 3 次, 复苏 24 h。采用水测法和压碎法检测钉螺死亡情况。统计各组钉螺死亡率并计算半数致死浓度 (LC_{50})。

4 MI 对斑马鱼、河虾和泽蛙蝌蚪的毒性试验

采用半静态法进行毒性测定^[5]: 将 MI 用去氯水配制成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 mg/L 等系列浓度, 在桶中盛 20 L MI 溶液, 投入斑马鱼、河虾或泽蛙蝌蚪 20 尾, 于 24、48 和 72 h 观察实验动物的反应并统计死亡情况, 计算死亡率。每天更换掉 50% 供试溶液, 去氯水作为阴性对照, 试验重复 3 次。整个试验期间不喂食, 每天保持 12~16 h 的光照, 温度控制在 (25±1) °C。

5 MI 对蚯蚓的毒性试验

采用自然土壤法^[6]: 将 MI 均匀拌入自然土壤中, 终浓度分别为 1 和 10 mg/kg, 分别取土壤 500 g 置于 1 000 ml 烧杯中, 加蒸馏水保持土壤最大持水量的 60%。在各烧杯中分别放入 10 条蚯蚓, 置于室温 (25±1) °C 进行培养, 并在第 7 和 14 天各计数 1 次, 检查蚯蚓中毒症状和死亡数, 计算死亡率。设空白对照组, 试验重复 3 次。

6 MI 对土壤微生物的毒性试验

采用密闭碱液直接吸收法^[7]: 取风干、过筛 (2mm) 的表层土壤 50 g, 置于 100ml 干燥小烧杯中, 加入 5 ml 水润湿, 将烧杯放入 2.5 L 的干燥广口瓶中, 密闭; 在 25 °C 恒温培养箱中培养 7 d。在土样中加入 MI 使终浓度为 10 mg/kg, 在广口瓶中放入装有 40 ml 0.6 mol/L NaOH 溶液的烧杯, 设空白对照组。分别在 第 2、5、7、10、12 和 15 d 取出 NaOH 溶液, 同时 换入新鲜的 NaOH 溶液, 继续培养。向取出的 NaOH 溶液中加入 2 滴酚酞指示剂和 5 ml 20% 的 BaCl₂ 溶液, 并用 0.376 mol/L 的 HCl 溶液滴定。根据 HCl 溶液的消耗量计算 W 即每 100 g 干土的 CO₂ 释放量。按以下公式计算: W = (空白值 - 滴定值) × 盐酸摩尔浓度 × CO₂ 分子量 × 50 / 干土质量。

7 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, LC₅₀ 值采用加权概率单位法计算。

结 果

1 MI 的杀螺效果

与对照组相比, 杀螺有效成分 MI 呈现显著的杀灭钉螺活性, 其 24、48 和 72 h 杀灭钉螺的 LC₅₀ 值分别为 0.101、0.062 和 0.022 mg/L (表 1)。

表 1 MI 杀灭钉螺的 LC₅₀ 值测定结果 (95% 可信限, n=3)
Table 1 The LC₅₀ of MI against *Oncomelania hupensis* (95% CI, n=3)

浓度/mg·L ⁻¹ Concentration/mg·L ⁻¹	不同浸泡时间的杀螺率/% Molluscicidal effect with immersion time/%		
	24 h	48 h	72 h
MI	100	100	100
0.60	100	100	100
0.40	91.11±1.92	100	100
0.20	63.33±3.33	100	100
0.10	47.78±1.92	82.22±1.92	100
0.08	42.22±1.92	64.44±5.09	100
0.06	36.67±3.33	46.67±3.33	84.44±1.92
0.04	0	20.00±3.33	65.56±1.92
0.02	0	2.22±1.92	51.11±1.92
0.01	0	0	17.78±1.92
去氯水 Dechlorinated tap water	0	0	0
氯硝柳胺 Niclosamide	95.56±1.92	100	100
半数致死浓度 LC ₅₀	0.101 (0.072-0.131)	0.062 (0.058-0.066)	0.022 (0.011-0.033)

2 MI 对斑马鱼的毒性试验结果

试验过程中斑马鱼首先表现为游动速度加快, 而后速度减慢, 游动不灵活, 偶尔在桶内乱窜。斑马鱼的死亡率随药物浓度升高而增高, 24、48 和 72 h 的 LC₅₀ 值分别为 1.941、1.755 和 1.219 mg/L。按照农药毒性分级标准^[8], MI 对斑马鱼的毒性属于中等毒性。

3 MI 对河虾的毒性试验结果

河虾中毒症状为运动速度减慢, 死亡率随药物浓度升高而增高, 24、48 和 72 h 的 LC₅₀ 值分别为 3.170、2.720 和 2.419 mg/L。按照农药毒性分级标准^[8], MI 对河虾的毒性属于中等毒性。

4 MI 对蛙类蝌蚪的毒性试验结果

试验中蝌蚪的中毒症状表现为游动失去平衡, 有时侧翻, 个别体瘦和尾巴卷曲。蝌蚪的死亡率随药物浓度升高而增高, 24、48 和 72 h 的 LC₅₀ 值分别为 2.109、1.751 和 1.288 mg/L。目前尚无正式颁布的农药对蛙类的毒性等级划分标准, 国家环保总局建议参照农药对鱼类的毒性划分标准^[8], MI 对泽蛙蝌蚪属于中等毒性。

5 MI 对蚯蚓的毒性试验结果

MI 高剂量组 (10 mg/kg) 个别蚯蚓身体轻度变细小; 低剂量组 (1 mg/kg) 未见明显中毒症状, 形态正常, 两剂量组蚯蚓均未出现死亡现象。农药对蚯蚓的毒性分级标准采用《化学农药环境安全评价的试验准则》中提出的标准^[8], MI 对供试蚯蚓的 LC₅₀> 10.0 mg/kg, 属于低毒级。

6 MI 对土壤微生物的毒性试验结果

与空白对照组比较, 施加 MI 后土壤微生物的 CO₂ 释放量减少, 在试验的 0~7 d, CO₂ 的释放量逐渐下降至最低 (38.0512 mg/100 g 干土), 说明 MI 对土壤微生物的呼吸有一定的抑制作用; 而后呈现回升趋势, 至第 10 天升至最高 (56.8011 mg/100 g 干土); 第 10 天以后 CO₂ 释放量缓慢降低, 并逐渐稳定 (图 1)。

采用田间用量等级划分法评价 MI 对土壤微生物呼吸的影响^[9]。MI 剂量为 10 mg/kg, 15 d 内对微生物呼吸的抑制率均低于 50% (表 2)。据上述毒性等级划分标准, MI 对土壤微生物毒性属于低毒级。

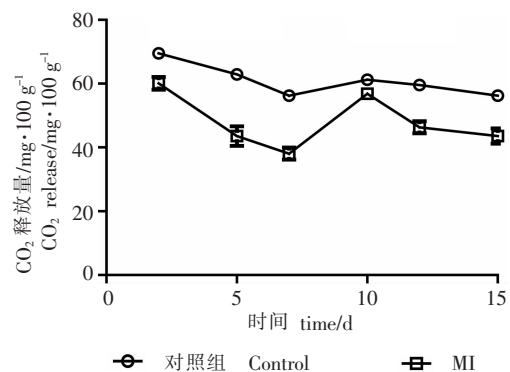


图 1 MI 对土壤微生物呼吸作用的抑制
Fig. 1 Effect of the MI on microorganisms in soil

表 2 MI 对土壤微生物呼吸作用的影响
Table 2 Effect of the MI on microorganisms in soil

时间/d time/d	CO ₂ 释放量/mg·100 g ⁻¹ Released amount of CO ₂ /mg·100 g ⁻¹		抑制率/% Inhibition rate/%
	用药组 Treated with MI	对照组 Control	
2	60.109 9±3.443 9	69.484 8	13.49 21±4.956 3
5	43.565 9±5.318 2	62.867 2	30.701 8±8.459 3
7	38.051 2±3.308 8	56.249 6	32.352 9±5.882 4
10	56.801 1±1.910 3	61.282 8	7.207 2±3.120 8
12	46.323 2±3.308 8	59.558 4	22.222 2±5.555 6
15	43.565 9±4.163 5	56.249 6	22.549 0±7.401 8

讨 论

硫代二酮哌嗪类化合物具有包括抗肿瘤和抗菌活性等在内的多种生物活性^[10-11]，且对水稻纹枯、终极腐霉和立枯丝核等多种植物病原菌具有拮抗作用，是发挥防御作用的重要因子^[12]，但有关其杀螺活性的研究尚未见报道。

斑马鱼作为一种重要的模式生物是实验室标准毒理学检测最常用的实验动物^[13]，奚伟萍等^[14]认为含 4% 氯硝柳胺乙醇胺盐的强螺杀粉剂对斑马鱼的 LC₅₀ 为 0.142 mg/L (48 h)，属于高毒杀螺剂；而 MI 对斑马鱼为中等毒性，与银杏酸和茶皂素等植物来源的灭螺成分鱼类毒性相当。且 MI 对斑马鱼的 LC₅₀ 与 MI 对钉螺的 LC₅₀ 相比较，同样与药物作用 24、48 和 72 h，前者分别是后者的 19.218、28.306 和 55.409 倍，可见 MI 对斑马鱼的毒性远远低于对钉螺的毒性，即在有效杀螺浓度范围内，MI 对斑马鱼是安全的。河虾是养殖鱼塘中常见的水生生物，MI 浓度低于 1.0 mg/L 时各处理时间内河虾均未出现死亡，而 MI 浓度为 0.6 mg/L 时，各处理时间的钉螺死亡率已达 100%，在有效杀螺浓度范围内，MI 对河虾基本无致死作用。蛙类的蝌蚪期对药物的反应最敏感，MI 对蝌蚪的 LC₅₀ 与 I 对钉螺的 LC₅₀ 相比较，同样与药物作用 24、48 和 72 h，前者分别是后者的 20.881、28.242 和 58.545 倍，即在有效杀螺浓度范围内，MI 对蝌蚪较安全。同时 MI 对蚯蚓和土壤微生物的毒性为低毒。

杀螺活性成分 MI 对水生和陆生非靶生物较安全，具有开发成为安全有效的杀螺剂或者杀螺剂先导化合物的潜力和价值。关于杀螺活性成分 MI 的降解规律和中间降解产物等问题有待进一步研究，为最终 MI 的开发和应用提供科学依据。

参 考 文 献

[1] Zhou XN, Wang LY, Chen MG, et al. The public health significance and control of schistosomiasis in China--then and now

[J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 97-105.
 [2] Chen SX, Wu L, Yang XM, et al. Comparative molluscicidal action of extract of *Ginko biloba* sarcotesta, arecoline and niclosamide on snail hosts of *Schistosoma japonicum* [J]. Pest Biochem Phys, 2007, 89(1): 237-241.
 [3] Guo DZ, Chen J, Du XP, et al. Screening of molluscicidal strain against *Oncomelania hupensis* from rhizosphere of medicinal plant *Phytolacca acinosa* Roxb.[J]. Phcog Mag, 2010, 6(23): 159-165.
 [4] Guo DZ, Chen J, Liu YD, et al. A high-performance molluscicidal ingredient against *Oncomelania hupensis* produced by a rhizospheric strain from *Phytolacca acinosa* Roxb. [J]. Phcog Mag, 2011, 7(28): 277-283.
 [5] Xu DM, Li F, Feng JT, et al. Toxicity of botanical substances to *Carassius auratus* and safety assessment [J]. Chin J Pest Sci, 2004, 6(3): 89-92. (in Chinese)
 (徐敦名, 李飞, 冯俊涛, 等. 几种植物源提制品对鱼的毒性与安全性评价[J]. 农药学报, 2004, 6(3): 89-92.)
 [6] Tian YN, Cai LM, Hui XJ, et al. Acute toxicity effects of flumorph and carbendazim on earthworm [J]. Agrochemicals, 2007, 46(7): 475-476. (in Chinese)
 (田亚男, 蔡磊明, 惠秀娟, 等. 杀菌剂氟吗啉和多菌灵对蚯蚓的急性毒性[J]. 农药, 2007, 46(7): 475-476.)
 [7] Zhu LS, Wang J. Effects of acetochlor and atrazine on respiration of soil microbe[J]. Soi Environm Sci, 2000, 9(1): 71-72. (in Chinese)
 (朱鲁生, 王军. 乙草胺和莠去津对土壤微生物的影响及安全性评价[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 71-72.)
 [8] Cai DJ, Yang PZ, Gong RZ, et al. Criterion of chemical pesticide environmental safety evaluation [S]. Beijing: National Environmental Protection Bureau, 1989. (in Chinese)
 (蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 北京: 国家环境保护局, 1989.)
 [9] Wang ZH, Zhou B, Yuan X. Influence of some pesticides to soil microorganisms respiration and safety evaluation [J]. Pest Sci Admin, 2005, 26(6): 13-16. (in Chinese)
 (王占华, 周兵, 袁星. 4 种常见农药对土壤微生物呼吸的影响及其危害性评价[J]. 农药科学与管理, 2005, 26(6): 13-16.)
 [10] Han XX, Xu XY, Cui CB, et al. Diketopiperazines produced by marine-derived *Aspergillus fumigatus* H1-04 and their antitumor activities [J]. Chin J Med Chem, 2007, 17(3): 155-159. (in Chinese)
 (韩小贤, 许晓妍, 崔承彬, 等. 海洋真菌烟曲霉 H1-04 发酵液中的硫代二酮哌嗪类产物及其抗肿瘤活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(3): 155-159.)
 [11] Masanori O, Keizo Y, Itsuo U, et al. Studies of platelet activating factor (PAF) antagonists from microbial products. I. Bisdethiobis (methylthio) gliotoxin and its derivatives [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(1): 340-344.
 [12] Liu LN, Tu YL, Zhang JZ. Biocontrol potential of *Trichoderma virens* strain TY009 against rice sheath blight and other main fungal diseases[J]. Sci Agr Sin, 2010, 43(10): 2031-2038. (in Chinese)
 (刘路宁, 屠艳拉, 张敬泽. 绿木霉菌株 TY009 防治纹枯病等水稻主要真菌病害的潜力 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(10): 2031-2038.)
 [13] Zhao YD, Wang DL, Lai YP, et al. Toxicity of some pesticides to *Brachydanio rerio* and safety valuation [J]. Pest Sci Admin, 2008, 29(8): 25-29. (in Chinese)
 (赵宇丁, 王冬兰, 来有鹏, 等. 一些常用农药对斑马鱼的毒性与安全性评价[J]. 农药科学与管理, 2008, 29(8): 25-29.)
 [14] Xi WP, Huang YX. Acute toxicity to *Brachydanio rerio* of qianguocide powder [J]. Chin J Schisto Control, 2004, 16(1): 63-64. (in Chinese)
 (奚伟萍, 黄轶昕. 强螺杀粉剂急性鱼毒实验观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2004, 16(1): 63-64.)