



粘细菌 *Corallococcus* sp. strain EGB 及其培养发酵液的安全性评估

乔燕, 夏丞垚, 李永凯, 李周坤, 叶现丰, 罗雪, 黄彦, 曹慧, 崔中利*

南京农业大学生命科学学院, 农业农村部农业环境微生物重点实验室, 江苏 南京 210095

乔燕, 夏丞垚, 李永凯, 李周坤, 叶现丰, 罗雪, 黄彦, 曹慧, 崔中利. 粘细菌 *Corallococcus* sp. strain EGB 及其培养发酵液的安全性评估. 微生物学报, 2022, 62(1): 227–241.

Qiao Yan, Xia Chengyao, Li Yongkai, Li Zhoukun, Ye Xianfeng, Luo Xue, Huang Yan, Cao Hui, Cui Zhongli. Toxicological evaluation of *Corallococcus* sp. strain EGB and its ferments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 227–241.

摘要: 【目的】研究粘细菌 *Corallococcus* sp. strain EGB 及其细胞培养发酵液的毒理安全性, 为菌株 EGB 作为新型生防微生物菌剂的开发和环境施用安全性提供一定的科学基础。【方法】通过 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和小鼠睾丸染色体畸变试验测定粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的遗传毒性; 通过经口灌胃的方式测定粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对 ICR 小鼠的急性毒性和 28 d 亚急性毒性。【结果】Ames 试验、微核试验和精母细胞染色体畸变试验结果表明, 与对照组相比, EGB 菌体及其细胞培养发酵液无基因突变能力, 对 ICR 小鼠无明显的遗传毒性。EGB 菌体及其细胞培养发酵液对 ICR 小鼠的急性经口半致死剂量(LD_{50}) >10 g/kg BW (body weight); 连续灌胃 28 d 后, 处理组 ICR 小鼠的体重变化、采食饮水、血液生化指标、血常规、主要脏器指数和主要器官病理切片与对照组相比无显著差异($P<0.05$)。【结论】粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的毒理安全性属于无毒类别, 粘细菌的生物安全性使其在工农业领域的植物病害控制和生物转化等方面具有潜在的应用价值。

关键词: 粘细菌 EGB; 发酵液; 安全评估; 遗传毒理; 亚长期毒理

基金项目: 江苏省现代农业面上项目(BE2020340); 国家自然科学基金(32070027, 32000101, 31700054); 中国博士后科学基金(2020M671513)

Supported by the Key Research and Development Plan of Jiangsu Province (BE2020340), by the National Natural Science Foundation of China (32070027, 32000101, 31700054) and by the Postdoctoral Science Foundation of China (2020M671513)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84396753; E-mail: czl@njau.edu.cn

Received: 28 March 2021; Revised: 22 June 2021; Published online: 29 October 2021

Toxicological evaluation of *Corallococcus* sp. strain EGB and its ferments

QIAO Yan, XIA Chengyao, LI Yongkai, LI Zhoukun, YE Xianfeng, LUO Xue, HUANG Yan, CAO Hui, CUI Zhongli*

Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] We evaluated the safety of *Corallococcus* sp. strain EGB to provide a scientific basis for the development of novel biocontrol agent and its safe application to the environment. [Methods] The genotoxicity of the cells and fermentation products of strain EGB were investigated by Ames test, polychromatic erythrocyte micronucleus test, and testis spermatocyte chromosome aberration assay in mice. Intragastric administration was employed to study the acute toxicity and 28-d subchronic toxicity. [Results] The results of Ames test, polychromatic erythrocyte micronucleus test, and testis spermatocyte chromosome aberration assay in mice revealed that the cells and fermentation products of strain EGB exhibited no genotoxic potential within the testing system. The LD_{50} values of the cells and fermentation products of strain EGB were greater than 10 g/kg BW in ICR mice. In the 28 days subchronic toxicity test, the body weight, food and water consumption, blood biochemical indexes, blood routine parameters, organ weights, and histopathology of treatment groups showed no difference compared with those of the control group ($P < 0.05$). [Conclusion] Strain EGB and its ferments could be classified as no toxicity and are safe for practical application in the plant disease control and bioconversion.

Keywords: *Corallococcus* sp. strain EGB; ferments; safety evaluation; genotoxicity; subchronic toxicity

我国农业生产过程中, 提高作物产量和保护粮食安全至关重要^[1-2]。然而, 全世界因植物病虫害造成的损失约占主要作物总产量的17%–30%, 直接经济损失达数千亿美元^[3]。目前, 化学杀虫杀菌剂在提高作物产量和延长食品货架期等方面发挥着关键作用^[4]。但是, 长期使用化学农药所造成的病原菌抗性、环境残留以及对有益生物的毒性等一系列问题, 都严重影响绿色农业发展和环境生态安全^[5-7]。此外, 已有研究表明, 化学农药制剂对人类健康带来潜在的威胁, 其环境残留和食物链富集可能引起包括癌症、白血病和哮喘等在内的多种疾病的发生^[8-10]。近年来, 生物防治作为一种可持续性和生态友好的病害控制方法, 得到了

研究者的普遍关注^[2]。

生物防治是指利用自然界中的微生物来控制病原体种群数量, 抑制或者降低其对动植物的侵染率, 从而保护动植物的健康。目前, 关于基于微生物的生物防治研究主要集中在菌株的抗菌效果评估和抗菌机制解析等方面, 而缺少对于生防微生物的生物安全性研究。随着人们对于绿色农业和生态安全性的日益关注, 生防微生物的环境安全性越来越受到人们的重视^[11]。枯草芽孢杆菌 Tpb55 菌株对多种植物致病菌有较强的抑制作用, 在使用剂量为 5 000 mg/kg 的条件下无急性毒性和眼、皮肤接触无明显毒性迹象^[12]。绿僵菌被认为是一种重要的真菌杀虫剂, 其在大鼠体内的 LD_{50} 值大于 2 000 mg/kg, 属于无毒

物质^[13]。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)来源的 Bt 蛋白广泛应用于棉铃虫的防控, 然而陈源^[14]发现转苏云金芽孢杆菌菌悬液存在影响水环境中的鱼类生长的潜在危害。当剂量为 2.73×10^6 CFU、 3.38×10^6 CFU 时, 会使得斑马鱼和鲫鱼肝脏、肾脏和肠道出现组织病变。此外, 部分枯草芽孢杆菌能分泌对红细胞有溶血作用的溶血素, 存在潜在的环境安全隐患^[15-16]。

粘细菌(Myxobacteria)是一类在土壤中普遍存在的革兰氏阴性菌, 具有依赖于细胞浓度的群体生长、群体运动(冒险性运动和社会性运动)、子实体形成等复杂的社会性行为特征^[17-18]。粘细菌作为一类独特的捕食性微生物类群, 能够感知环境中猎物的存在进而启动群体捕食行为^[19]。粘细菌在与猎物细胞直接接触过程中, 通过分泌多种裂解酶和次级代谢产物来杀死猎物细胞^[20], 进而完成“狼群捕食”^[19]过程。粘细菌分泌的裂解酶类主要包括蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、几丁质酶、葡聚糖酶等, 分泌的次级代谢物主要包括具有抗菌作用的抗生素等, 这些水解酶和次级代谢物具有独特的结构和生物活性, 在抗癌、抗菌和多糖转化等方面发挥重要的作用^[21-25]。本课题组前期从土壤中分离得到具有广谱抗病原真菌的粘细菌 EGB, 该菌株属于粘球菌目, 孢囊杆菌亚目, 粘球菌科, 珊瑚球菌属, 与珊瑚球菌属中 *Corallocooccus coralloides* DSM 51548 的 16S rRNA 基因序列一致性为 100%, 因此将其命名为 *Corallocooccus* sp. strain EGB。研究表明, 粘细菌 EGB 能有效控制包括稻瘟病菌、稻曲病菌、枯萎病菌、棉花黄萎病菌等在内的多种植物病原真菌的生长^[26]。粘细菌 EGB 对于病原菌的抗菌活性存在多种作用机制, 包括分泌一种新型外膜抗菌蛋白 β -1,6-葡聚糖酶 GluM^[27]水解病原真菌的细胞壁、产生长距离挥发性抗菌物质抑制病原真菌的生长^[28]及

通过捕食行为调控土壤中的微生物群落结构等^[29]。田间试验结果表明, 粘细菌 EGB 在土传植物真菌病害控制方面表现出良好的防控效果, 表明其作为一类新型生防微生物, 在农业生产过程中的病害控制方面具有重要的应用潜力。

已有的研究结果显示, 粘细菌 EGB 在农业生产过程中植物病害控制方面展示出良好的应用潜力, 然而, 关于粘细菌及其培养发酵液生物安全性的研究尚无报道。目前, 针对微生物菌剂的生物安全评价体系, 美国、加拿大、澳大利亚、欧盟、日本早在上世纪末就建立了微生物农药安全评价技术, 并制定了相关管理规范^[30]。而我国也在 2012 年发布了 NY/T 2186—2012《微生物农药毒理学试验准则》, 该准则给出了毒理学方面的试验方法及其评价方法。准则要求从急性经口毒性、急性经呼吸道毒性、急性注射毒性、细胞培养试验、亚慢性毒性和生殖影响等 6 个方面对新型微生物农药进行生物安全性评估。因此本文从急性毒性、亚急性毒性和遗传毒性等具有代表性的方面研究粘细菌 EGB 及其细胞培养发酵液的毒理安全性, 为基于粘细菌 EGB 开发广谱抗菌微生物菌剂应用于农业生产中的真菌病害控制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

粘细菌 *Corallocooccus* sp. strain EGB, 自筛, 保存于南京农业大学农业农村部农业环境微生物重点实验室。鼠伤寒沙门菌突变型(组氨酸营养缺陷型) TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株购自汇智泰康生物技术(北京)有限公司, 经组氨酸缺陷、脂多糖屏障缺陷、氨基青霉素抗性、四环素抗性、紫外线修复缺陷鉴定均符合试验要求。

1.1.2 供试动物

健康 SPF (specific pathogen free)级 ICR 小鼠, 5–6 周龄, 体重 18–22 g, 购自扬州大学比较医学中心, 生产许可证号: SYXK(苏)2017-007。小鼠饲养和试验操作均于南京农业大学实验动物中心进行。标准饲养实验室条件: 温度 (25±2) °C, 相对湿度(50±5)%, 12 h 黑白交替, 每笼 5–6 只, 饮食和饮水充足, 笼具每周清洗消毒 2 次, 垫料每周更换 2 次。正式试验开始前, 小鼠适应性饲养 3–5 d。动物试验遵循《江苏省实验动物管理办法》中的规定。所有动物试验均按照南京农业大学伦理委员会推荐的方案进行。

1.1.3 主要试剂和仪器

瑞氏-吉姆萨染色液、秋水仙素、环磷酰胺购自上海生工生物工程公司。FD-A10N-50 冻干机、Allegra X-22R 台式高速冷冻离心机、BX53M 光学显微镜、BC-2800vet 血细胞分析仪、Chemray 800 自动生化分析仪。

1.2 供试菌体和发酵液制备

冷冻甘油保存的菌株 EGB 在 VY/4 固体培养基(酵母细胞 0.25%, CaCl₂ 0.10%, pH 7.0)上活化培养^[26], 挑取边缘新鲜扩散的粘细菌到 LBS 液体培养基(酵母提取物 0.5%, 淀粉 0.7%, 胰蛋白胨 0.1%, MgSO₄ 0.1%, pH 7.0)中^[31], 30 °C 条件下培养 24 h, 转接至 YST 发酵培养基(酵母细胞 1%, 淀粉 0.07%, 胰蛋白胨 0.01%, MgSO₄ 0.06%, pH 7.0), 30 °C 条件下培养 3–4 d。培养结束后, 发酵液中所含菌体数为 2.3×10¹¹ 个/L, 所含总蛋白浓度为 75 mg/L。将粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液直接冷冻干燥, 得到包含菌体和培养发酵液的深棕色固体粉末, 放置于无菌的密封袋中, -20 °C 保存。试验前, 将固体粉末混悬于无菌水中配制成特定浓度的待测物悬浮液。

1.3 急性毒性试验

方法参考庄敬华等^[32], 略作修改。具体地, 将 20 只 ICR 小鼠(雌雄各半)随机分为 2 组, 一组灌胃无菌水作为对照组, 另一组灌胃待测物悬浮液(10 g/kg body weight, 无菌水)作为试验组。采用一次最大限量法灌胃对 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的急性毒性进行考察。灌胃前对小鼠称重, 按照 10 g/kg BW 的剂量给试验组灌胃 EGB 菌体及其细胞培养发酵液, 同时给对照组灌胃相同体积(10 mL/kg BW, 一次最大限量法灌胃)的无菌水。灌胃前小鼠 16 h 隔夜禁食, 不禁水。灌胃后连续 14 d 内每天 2 次观察小鼠的反应, 有无因待测物灌胃引起的中毒表现或者死亡情况的发生。灌胃前、第 7 天和第 14 天记录小鼠体重。第 15 天, 所有小鼠隔夜禁食 16 h 后, 颈部脱臼处死, 立即进行解剖, 观察动物体表及脏器有无异常或病变。

1.4 Ames 试验

剂量设计为 40、500、1 000、5 000 μg/皿。采用平板掺入法, 按照试剂盒提供的步骤进行操作。(1) 加热融化顶层培养基, 取 2 mL 分装于无菌试管中, 45 °C 水浴保温。(2) 向保温的顶层培养基中依次加入: 0.1 mL 测试菌液、0.1 mL 待测物悬浮液; 根据试验需求, 加入 0.5 mL 10% S-9 混合液(活化)。充分混匀, 迅速倾入底层培养基上, 转动平皿使顶层培养基均匀分布, 平放固化。37 °C 倒置培养 48 h, 观察结果。同时, 设置不添加 S-9 混合液(非活化)实验组。(3) 试验设定了阳性对照、溶剂对照和未处理对照: 阳性对照为标准诱变剂(敌克松, dexamethasone、2-氨基苄, 2-aminofluorene、甲基磺酸甲酯, methyl methane sulfonate、1,8-二羟基蒽醌, 1,8-dihydroxyanthraquinone), 在活化和非活化 2 种情况下菌株与相对应的标准诱变剂见表 1; 溶剂对照使用无菌水作为对照; 未处理对照指

表 1 突变菌株阳性对照诱变剂

Table 1 The mutagenic agent of mutant strain as positive control

S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
(+)	Dexon	Dexon	Methyl methane sulfonate	Methyl methane sulfonate
(-)	2-aminofluorene	2-aminofluorene	2-aminofluorene	1,8-dihydroxyanthraquinone

仅向培养基中加入包含粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液的待测物悬浮液, 不加入待测物或标准诱变剂。

1.5 微核试验

方法参考 Yang 等^[33], 略作修改。具体地, 将 60 只 ICR 小鼠(雌雄各半)随机分 5 组, 分别是阳性对照组(环磷酰胺, 40 mg/kg BW)、正常对照组(同等体积无菌水)和试验组(剂量设计为 2.5、5.0、10.0 g/kg BW 包含粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液的冻干粉)。采用 30 h 给受试物法, 即 2 次给受试物间隔 24 h, 第二次给受试物后 6 h, 颈部脱臼处死小鼠。取胸骨, 剔除周围多余的肌肉组织和擦去血污, 剪掉骨髓端, 露出骨髓腔, 用止血钳挤出骨髓液与位于玻片一端的小牛血清混匀。按血清学常规涂片法涂片, 血涂片自然干燥后放入甲醇固定 10 min, 晾干。用瑞氏-姬姆萨染色液(pH 6.4–6.8)染色 8 min, 水洗, 晾干。选择细胞完整、分布均匀和着色适当的区域, 在油镜下观察。镜头下, 成熟红细胞呈浅红色, 嗜多染红细胞呈灰蓝色。典型的微核多为单个的、圆形、边缘光滑整齐, 呈紫红色。每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞, 观察含有微核的嗜多染红细胞数, 计算微核率 MN% (微核数与嗜多染红细胞数的比值)和嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE%)。

1.6 染色体畸变试验

方法参考 Yang 等^[33], 略作修改。具体操作为, 将 30 只雄性 ICR 小鼠随机分 5 组, 分别是阳性对照组(环磷酰胺, 40 mg/kg BW)、正常对照组(同等体积无菌水)和试验组[剂量设计为

2.5、5.0、10.0 g/(kg·d) BW 包含粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液的冻干粉]。灌胃给予受试物, 每天 1 次, 连续 5 d, 间隔 24 h。各组在第 1 次给与受试物后的第 14 天将小鼠颈部脱臼处死。小鼠处死前 6 h, 腹腔注射新鲜配制的秋水仙素 4 mg/kg BW。取出两侧睾丸, 用眼科镊剔除周围脂肪, 于冰生理盐水中洗去血污和毛发。按照以下步骤制作观察玻片: (1) 低渗, 用眼科镊撕开睾丸外层被膜, 轻轻地分离曲细精管, 37 °C、低渗 30 min。(2) 固定, 用移液器将低渗液全部吸尽, 加入固定液(甲醇:冰乙酸=3:1), 曲精细管完全被固定液没过为宜, 固定 20 min。(3) 软化, 用移液器将固定液全部吸尽, 加入 60%冰乙酸 1 mL 软化 5 min。(4) 离心, 待曲细精管大部分软化后, 加入 1 mL 固定液, 移液枪轻轻吹打, 移入离心管, 1 000 r/min 离心 10 min。(5) 滴片, 保留 0.5 mL 固定液, 移液枪轻轻吹打制成细胞悬浮液, 将细胞悬液均匀地滴在冰玻片上, 空气干燥。(6) 染色, 用瑞氏-姬姆萨染色液(pH 6.4–6.8)染色 8 min, 水洗, 晾干。在低倍镜下按玻片顺序寻找背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相精母细胞, 然后在油镜下进行仔细观察, 分析裂隙、断片、微小体、环状、单价体、三价体和链状四价体等结构畸变类型。每只动物观察 100 个精母细胞, 计算染色体畸变精母细胞与正常精母细胞的比值。

1.7 28 d 亚慢性毒性试验

方法参考 Jonker 等^[34], 略作修改。具体地, 将 80 只 ICR 小鼠(雌雄各半)随机分 4 组, 每组

20 只(每笼 5 只), 分别灌胃每天新鲜配制的包含粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液的冻干粉悬浮液 0、500、1 000、2 000 mg/(kg·d) BW, 连续 28 d。每天观察小鼠的反应, 有无灌胃引起的临床上的异常、中毒表现或者死亡情况的发生。每周记录每只小鼠的体重, 每天记录每笼小鼠采食量、饮水量。每周计算平均饲料转化率, 即体重增加与消耗饲料的比值。第 28 天, 所有小鼠隔夜禁食 16 h 后, 眼球摘除法取血, 然后颈部脱臼处死, 及时进行解剖, 观察动物体表及脏器有无异常或病变。摘取小鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、睾丸、卵巢、肾上腺、胸腺, 于滤纸上吸干表面血污, 记录相应器官的重量, 计算脏器指数, 即器官湿重与体重的比值。将小鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、睾丸、卵巢、十二指肠、胃、大腿肌肉放于多聚甲醛中固定, 经石蜡包埋、切片、HE 染色, 用于组织病理观察。所取血液部分放入带有 0.5 mol/L EDTA 抗凝剂的一次性采血管中, -20°C 保存。采用全自动血液细胞分析仪(BC-2800vet)进行血细胞分析, 包括白细胞总数(WBC)、红细胞总数(RBC)、血红蛋白(HGB)、血细胞比容(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、淋巴细胞百分比(Lymph%)、单核细胞百分比(Mon%)和中性粒细胞百分比(Gran%)。剩余血液室温下放置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清 -20°C 保存。采用全自动生化分析仪(Chemray 240)用于血清生理生化分析, 包括丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、总蛋白(TP)、总胆红素(TBIL)、肌酸酐(CR)、血液尿素氮(BUN)、钙(Ca)、磷(P), 钾(K)和氯(Cl)等。

1.8 数据处理

数据整理均表示为平均数 \pm 标准差(means \pm SD)。采用 SPSS version 20.0 进行统计学分析, 其中 Ames 试验分析采用 t 检验统计方法; 微核试验分析和染色体畸变试验分析采用 χ^2 检验; 急性毒理和 28 d 亚慢性毒理分析采用 One-Way ANOVA 方法进行方差分析, 结果进行 Duncan's multiple range test 多重比较, 各统计方法的显著水平均设定为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 急性毒性试验

将包含粘细菌 EGB 菌体和细胞培养发酵液的冻干粉以 10 g/kg BW (body weight) 剂量进行小鼠灌胃试验后 14 d 内, 小鼠采食和饮食正常, 无明显中毒症状或死亡的发生, 也没有表现出异常的体重增加或者减轻现象(表 2), 统计分析发现, 灌胃 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的小鼠与同性别的对照小鼠体重无显著性差异($P>0.05$)。对小鼠主要器官的解剖检查表明, 无肉眼可见的表现病理变化。结果表明粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对 ICR 小鼠的急性经口半致死剂量(LD_{50}) >10 g/kg, 根据《GB 15193.3-2003 急性毒性试验》的毒性分级评定, 属于实际无毒级别。

表 2 在急性毒性试验中粘细菌 EGB 及其细胞培养发酵液对小鼠体重的影响

Table 2 Effect of *Corallococcus* sp. strain EGB and its ferments on body weight of mice in oral acute toxicity test

Day	Male dose/(g/kg)		Female dose/(g/kg)	
	0	10	0	10
1	23.78 \pm 0.21	22.91 \pm 0.91	21.01 \pm 0.62	21.56 \pm 0.78
7	26.20 \pm 0.52	26.79 \pm 1.18	22.01 \pm 0.62	23.53 \pm 0.52
14	29.68 \pm 0.59	29.37 \pm 0.41	23.67 \pm 0.90	24.76 \pm 0.74

Results are presented as means \pm SD ($n=5$).

2.2 Ames 试验

利用 Ames 试验对粘细菌 EGB 及其细胞培养发酵液的基因致突变进行分析, 结果如表 3 所示。对于 TA98 突变菌株, EGB 菌株及其细胞培养发酵液在无代谢活化剂 S-9 条件下, 细菌的回落菌落数最高为 50 个, 与对照相比无显著差异($P>0.05$); 有代谢活化剂 S-9 条件下, 细菌的回落菌落数最高为 64 个, 与对照相比无显著差异($P>0.05$)。但是阳性对照在有和无代谢活化剂的条件下, 细菌的回落数均显著高于对照组($P<0.05$)。TA97、TA100 和 TA102 突变菌株的结果类似。同时, 各阳性诱变剂组能够产生微生物基因致突变的能力, 细菌回落菌落数均显著高于正常对照组的 2 倍以上($P<0.05$)。以上结果表明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液无微生物基因致突变的能力。

2.3 微核试验

微核试验通常用于分析待测物中是否存在染色体断裂剂。当染色体断裂剂这类毒物存在时, 细胞在有丝分裂后期染色体进入子细胞形成细胞核时, 细胞质中存在部分未进入细胞核的染色单体或染色体断片形成微核。将粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液经口灌胃给雌性和雄性 ICR 小鼠, 观察小鼠骨髓液中的嗜多染红细胞微核发生情况, 结果如表 4 所示。各剂量组诱导的微核发生率与正常对照组比较, 均无显著差异($P>0.05$); 阳性对照组的微核发生率显著高于正常对照组($P<0.05$)。根据《微生物农药毒理学实验准则》所示, 正常对照组的微核率通常小于 5‰。此外, 通常利用嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)作为细胞毒性的指标之一。各试验组 PCE/NCE 的比值均在 0.6–1.2 的正常值范围内, 表明 EGB 菌体及其细胞培养发酵液等处理组无明显的细胞毒性^[35]。微核试验结果说明, 粘细菌 EGB 菌体及

其细胞培养发酵液对 ICR 小鼠无诱发嗜多染红细胞微核率增高的作用, 即无诱导染色体损伤的能力。

2.4 染色体畸变试验

染色体畸变试验在 ICR 小鼠灌胃 EGB 菌体及其发酵产物后 14 d 取样, 可以观察待测物作用于精母细胞增殖周期中的前细线期引起的染色体畸变效应, 结果如表 5 所示。EGB 菌体及其细胞培养发酵液在 2.5、5.0、10.0 g/kg BW 灌胃浓度下, 小鼠精母细胞染色体畸变率分别是 0.5%、0.6%、0.5%, 正常对照组为 0.6%, 各剂量组未引起染色体结构畸变率的增高。与正常对照组相比, 阳性对照环磷酰胺组的结构畸变率为 4.3%, 经 X^2 检验差异显著($P<0.05$)。染色体畸变试验结果表明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠睾丸精母细胞染色体未显示出致突变效应, 小鼠睾丸精母细胞试验结果为阴性。

2.5 28 d 亚慢性毒性试验

在亚慢性毒性试验中, 连续 28 d 给 ICR 小鼠灌胃粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液, 在 28 d 的饲养试验过程中, 未观察到试验小鼠的死亡、中毒或行为异常等现象。与对照组相比, 各剂量组小鼠的体重变化趋势一致(图 1), 对照组雄鼠第 1 天平均体重为 28.35 g, 第 28 天平均体重为 43.17 g, 体重增加 52.8%; 高剂量组[2 000 mg/(kg·d)]雄鼠第 1 天平均体重为 29.90 g, 第 28 天平均体重为 42.02 g, 体重增加 40.02%。对照组雌鼠第 1 天平均体重为 28.53 g, 第 28 天平均体重为 31.85 g, 体重增加 11.6%; 高剂量组[2 000 mg/(kg·d)]雌鼠第 1 天平均体重为 29.38 g, 第 28 天平均体重为 32.38 g, 体重增加 11.2%。在各个测量体重时间点, 雄鼠和雌鼠的平均体重与对应对照组相比均无显著差异($P>0.05$)。28 d 喂养试验期间, 小鼠饮水和采食表现正常, 背部毛色有光泽, 眼睛红亮。

表 3 Ames 试验结果
Table 3 The Ames test results

Groups	Dose/ ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-(S-9)	+(S-9)	-(S-9)	+(S-9)	-(S-9)	+(S-9)	-(S-9)	+(S-9)
Determinand	5 000	102 \pm 1.41	136 \pm 4.95	50 \pm 6.66	56 \pm 4.58	153 \pm 4.95	148 \pm 8.08	83 \pm 9.44	132 \pm 3.61
	1 000	110 \pm 7.57	136 \pm 9.02	48 \pm 4.16	51 \pm 8.74	150 \pm 4.47	132 \pm 4.47	71 \pm 5.51	137 \pm 4.36
	200	110 \pm 9.07	134 \pm 9.90	43 \pm 7.55	64 \pm 5.51	147 \pm 1.41	132 \pm 3.47	85 \pm 5.51	131 \pm 4.04
	40	112 \pm 2.83	127 \pm 9.45	42 \pm 5.00	64 \pm 9.00	137 \pm 8.50	146 \pm 5.29	78 \pm 8.02	127 \pm 7.81
Solvent control		112 \pm 2.83	121 \pm 7.09	46 \pm 9.72	41 \pm 6.20	150 \pm 8.49	149 \pm 6.09	79 \pm 9.24	139 \pm 6.36
Normal control		115 \pm 1.53	125 \pm 2.89	49 \pm 1.73	40 \pm 5.51	142 \pm 4.36	143 \pm 7.37	68 \pm 5.01	140 \pm 7.02
Dexon		236 \pm 13.21*		680 \pm 12.45*					
2-aminofluorene			992 \pm 10.30*		920 \pm 11.23*		524 \pm 12.67*		
Methyl methane sulfonate						836 \pm 9.82*		319 \pm 15.78*	
1,8-dihydroxyanthraquinone									306 \pm 13.56*

Results are presented as means \pm SD ($n=3$); *: significantly different from the control group at $P<0.05$.

表 4 微核试验

Table 4 Micronucleus frequency of male and female mice in mutagenicity study

Groups	Dose/(g/kg)	Male		Female	
		MN/‰	PCE/%	MN/‰	PCE/%
Determinand	2.5	1.3±0.13	2.1±0.23	1.7±0.43	2.2±0.54
	5.0	2.2±0.44	1.8±0.30	2.2±0.76	2.2±0.14
	10.0	2.5±0.42	2.0±0.25	1.8±0.23	2.0±0.27
Normal control	–	1.9±0.52	1.9±0.22	1.8±0.81	2.1±0.42
Positive control	0.04	26.32±0.43*	1.9±0.18	14.98±0.58*	1.9±0.08

Results are presented as means±SD (n=6); *: significantly different from the control group at P<0.05.

表 5 睾丸精母细胞染色体畸变试验

Table 5 Testis spermatocyte chromosomal aberration of male mice in mutagenicity study

Group	Dose/[g/(kg·d)]	Number of spermatocyte	Aberration rate/%
Determinand	2.5	600	0.5
	5.0	600	0.6
	10.0	600	0.5
Normal control	–	600	0.6
Positive control	0.04	600	4.3*

Results are presented as means±SD (n=6); *: significantly different from the control group at P<0.05.

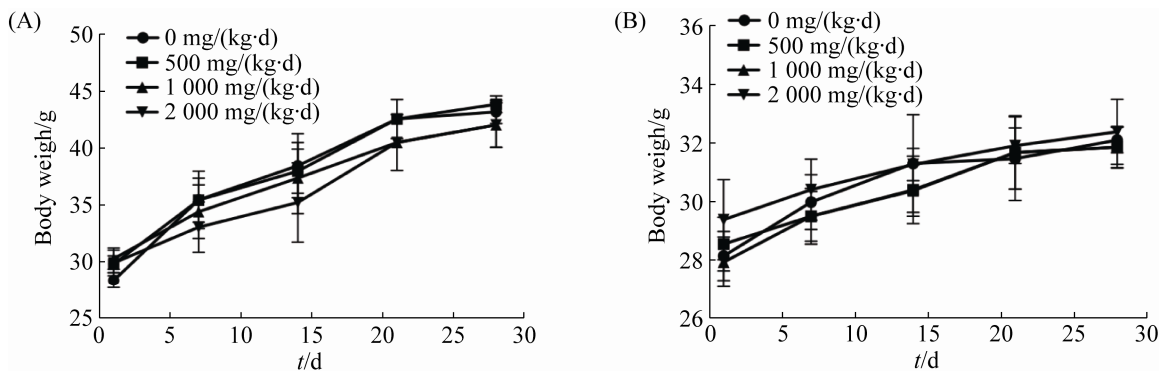


图 1 在 28 d 亚慢性毒性试验中粘细菌 EGB 及其细胞培养发酵液对小鼠体重的影响

Figure 1 Effect of *Coralloccoccus* sp. strain EGB and its ferments on body weight of mice in 28-day toxicity test. A: male mice; B: female mice (n=10).

亚慢性摄入方面的结果说明, 粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠正常的生长和生活不产生影响。

血常规结果可以用来判断小鼠血液中的白细胞系统和红细胞系统是否处于正常状态, 是否存在贫血、炎症感染、骨髓造血功能异常等

情况。血清生理生化结果则反映了小鼠肝脏和肾脏功能是否正常, 以及表征小鼠的糖代谢和脂肪代谢。连续 28 d 给 ICR 小鼠灌胃粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液, 第 28 天取小鼠血液进行血常规和血清生理生化分析, 结果如表 6 和表 7 所示。如表 6 所示, 小鼠灌胃 EGB

菌体及其细胞培养发酵液没有引起小鼠的血常规各项参数的变化($P>0.05$), 并且均处于正常值的范围内, 说明 EGB 菌体及其细胞培养发酵液不会影响小鼠造血功能和白细胞的生成, 从而不会导致贫血或者免疫功能降低的发生。同

样, 灌胃 EGB 菌体及其细胞培养发酵液也没有引起小鼠血清生理生化指标的变化($P>0.05$) (表 7), 并且均处于正常值的范围内, 表明粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液不影响小鼠肝脏、肾脏等主要器官的正常代谢功能。

表 6 在 28 d 亚慢性毒性试验中粘细菌 EGB 及其细胞培养发酵液对小鼠血常规指标的影响

Table 6 Effect of *Coralloccoccus* sp. strain EGB and its ferments on hematological parameters of mice in 28-day toxicity test

Index	Male dose/[mg/(kg·d)]				Female dose/[mg/(kg·d)]			
	0	500	1 000	2 000	0	500	1 000	2 000
WBC ($10^9/L$)	5.20±0.62	5.50±0.72	5.00±0.81	4.50±0.13	4.30±0.36	4.40±0.13	4.80±0.75	4.90±0.76
RBC ($10^{12}/L$)	8.60±1.02	9.51±0.24	9.27±0.70	9.93±0.33	10.64±0.91	10.45±0.15	11.12±0.79	10.39±0.07
HGB(g/L)	157.00±1.24	166.50±1.36	168.00±0.58	170.00±1.21	183.50±1.43	174.50±1.77	179.00±1.71	174.00±1.00
HCT/%	50.75±0.74	50.20±0.70	47.90±0.89	51.80±0.53	61.10±0.24	59.00±0.51	61.23±0.49	56.90±0.66
MCV/fl	55.20±0.34	52.80±1.21	54.65±0.77	52.26±0.75	54.76±1.67	56.50±0.91	54.96±0.92	52.96±0.58
MCH/pg	16.66±0.66	17.45±0.21	18.10±0.98	17.03±0.15	16.90±0.55	16.70±1.13	16.03±0.49	16.70±0.17
MCHC(g/L)	329.66±1.15	331.50±1.67	352.00±1.21	328.33±1.46	310.33±0.92	296.00±1.14	292.66±1.01	316.00±1.16
Lymph/%	74.45±0.19	65.90±0.67	72.80±0.97	66.50±1.32	70.83±1.86	73.86±0.91	70.80±0.70	72.40±0.85
Mon/%	2.83±0.70	2.80±0.14	2.80±0.15	2.80±0.42	2.90±0.36	2.65±0.07	2.90±0.22	2.56±0.66
Gran/%	27.56±0.83	31.30±0.80	26.80±0.65	30.96±1.06	26.03±0.65	25.70±0.98	26.30±0.65	25.03±1.21

Results are presented as means±SD ($n=10$).

表 7 在 28 d 亚慢性毒性试验中粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠血清生理生化指标的影响

Table 7 Effect of *Coralloccoccus* sp. strain EGB and its ferments on serum physiological and biochemistry indexes of mice in 28-day toxicity test

Index unit	Male dose/[mg/(kg·d)]				Female dose/[mg/(kg·d)]			
	0	500	1 000	2 000	0	500	1 000	2 000
ALT/(U/L)	29.34±3.62	33.73±1.46	29.53±4.79	30.17±4.52	33.34±3.89	31.45±3.72	30.62±7.56	31.28±3.99
AST/(U/L)	93.30±5.02	91.32±5.74	91.05±5.60	87.31±3.09	89.11±2.98	85.61±1.86	88.02±4.66	89.06±2.23
TBIL/($\mu\text{mol}/L$)	12.84±0.29	11.34±0.33	14.78±0.53	14.48±0.26	12.42±0.69	10.84±0.89	10.02±0.63	12.18±0.83
ALP/(U/L)	126.70±6.71	126.17±5.13	124.99±8.40	129.72±4.91	114.16±2.71	110.19±6.73	116.91±4.18	122.38±5.15
TC/(mmol/L)	5.24±0.54	6.16±0.16	5.70±0.17	6.47±0.79	4.97±0.50	4.97±0.47	5.25±0.60	5.57±0.31
TG/(mmol/L)	1.66±0.06	1.78±0.08	1.83±0.13	1.94±0.25	1.64±0.17	1.61±0.13	1.83±0.19	1.64±0.24
BUN/(mg/dL)	24.06±0.74	24.39±0.13	24.61±0.20	24.78±0.61	21.57±0.33	23.88±0.17	22.82±0.14	20.82±0.09
CR/($\mu\text{mol}/L$)	27.22±0.78	25.40±0.49	24.89±0.50	26.78±0.76	68.59±0.78	69.70±0.43	68.27±0.51	67.22±0.33
GLU/(mmol/L)	5.15±0.85	4.04±0.70	4.89±0.44	4.70±0.93	7.77±0.85	7.03±0.68	6.90±0.59	7.58±0.42
Ca/(mmol/L)	2.47±0.00	2.53±0.08	2.53±0.01	2.49±0.01	2.46±0.03	2.47±0.06	2.48±0.02	2.48±0.05
K/(mmol/L)	1.41±0.12	1.16±0.14	1.34±0.06	1.39±0.09	1.36±0.03	1.53±0.16	1.77±0.12	1.18±0.08
Cl/(mmol/L)	112.51±0.69	114.94±0.14	116.79±0.42	114.72±0.51	112.68±2.58	121.27±2.74	126.69±2.29	115.83±2.08
P/(mmol/L)	2.58±0.38	2.35±0.02	2.78±0.31	2.22±0.17	3.24±0.08	3.23±0.28	3.45±0.56	2.99±0.11

Results are presented as means±SD ($n=10$).

对连续灌胃 EGB 菌体及其细胞培养发酵液 28 d 的小鼠进行解剖学观察, 发现无肉眼可见的组织器官病变。从图 2 看出, 与对照组相比, 各处理组的器官指数(肝脏、脾脏、肾脏、心脏、睾丸、卵巢、肾上腺、胸腺)无显著性差异 ($P>0.05$)。对照组和高剂量组[2 000 mg/(kg·d) BW]的组织病理切片显微镜观察结果如图 3 和图 4 所示。肝脏中, 肝小叶清晰, 肝组织排列整齐、形态正常。肾脏中, 血管球、肾小囊和近端小管的结构清晰可见。脾脏中, 白髓和红髓界限分明, 可见动脉周围淋巴鞘、淋巴小结。心脏中, 可见短圆柱状、单核的心肌细胞紧密排列。小肠中, 小肠表面绒毛和阴窝结构完整, 上皮细胞之间界限清晰。胃部中, 粘膜层、粘膜下层和肌肉层等分布清晰可见。睾丸中, 观察到的是曲精小管的横截面, 从外向里依次可见精原细胞、初级精母细胞、精子细胞和成熟的精子。卵巢中, 可以观察到正在发育的初级卵泡和已经形成半月卵泡腔的次级卵泡。骨骼肌中, 可以观察到带有多核的骨骼肌纤维的横截面。以上结果表明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液不影响小鼠主要器官的组织结构。

3 讨论与结论

目前, 生物防治作为一种环境友好型的植物病害防治办法, 受到研究者的广泛关注。粘细菌 EGB 作为一种具有广谱抗真菌活性的新型生防微生物, 在土传植物病害控制和多糖生物转化方面具有重要的应用潜力。根据《注册农药毒理学试验方法》(中国农业部, 1995, GB15670-1995)的规定, 必须对一种新型化学农药/生物制剂进行农业管理安全使用的资格鉴定。《微生物农药毒理学实验准则》(NY/T 2186.1-2012)给出了毒理学方面的试验方法和评价准则。结合相关标准规定, 本文以 ICR 健康小鼠与鼠伤寒沙门菌突变型(组氨酸营养缺陷型)为试验对象, 对粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的生物安全性进行评估。急性毒性试验主要是观察一次性给小鼠灌胃包含 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的待测悬液后, 短期内小鼠行为、器官的毒性反应, 从而了解可能存在的急性毒性强度和可能的靶器官。结果表明粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠的半致死剂量 LD_{50} 大于 10 g/(kg·d) BW。

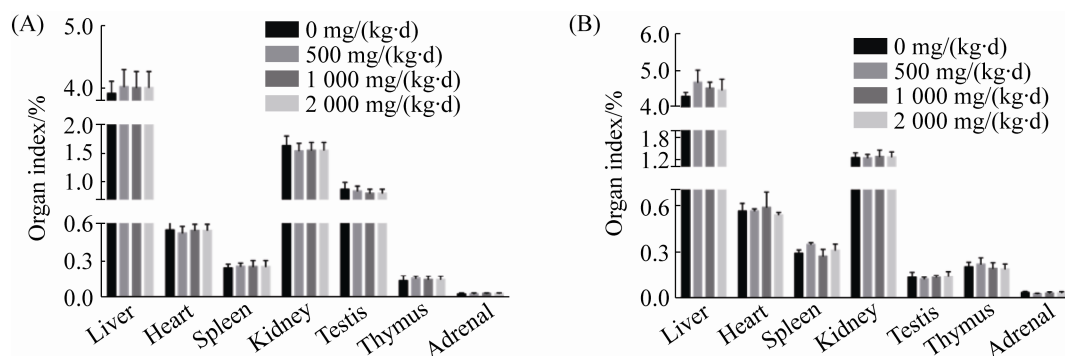


图 2 在 28 d 亚慢性毒性试验中粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠器官指数的影响

Figure 2 Effect of *Corallococcus* sp. strain EGB and its ferments on organ index of mice in 28-day toxicity test. A: male mice; B; female mice ($n=10$).

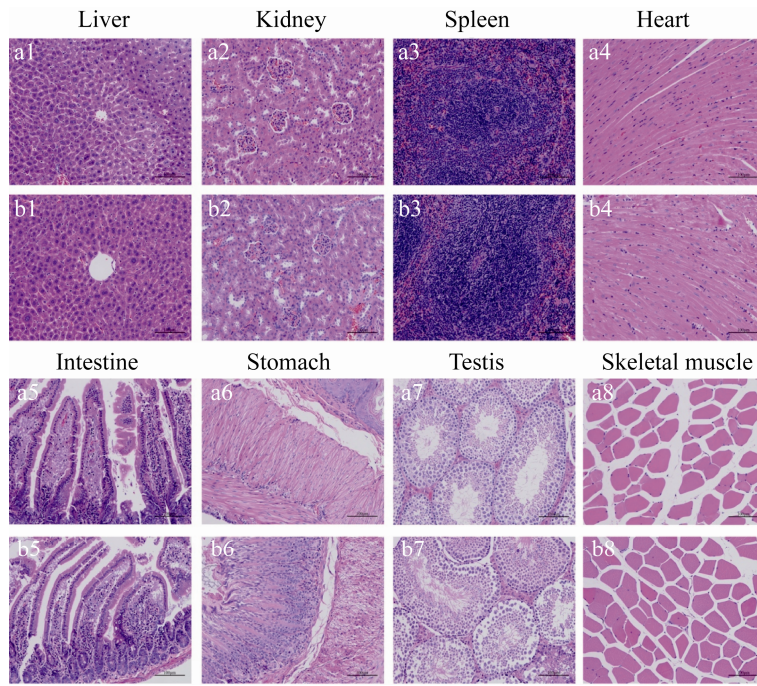


图3 在28 d亚慢性毒性试验中粘细菌EGB菌体及其细胞培养发酵液对雄鼠主要器官组织结构的影响
Figure 3 Effect of *Coralloccoccus* sp. strain EGB and its ferments on histological structure of main organs in male mice in 28-day toxicity test. a: 0 mg/(kg·d) BW; b: 2 000 mg/(kg·d) BW ($n=10$).

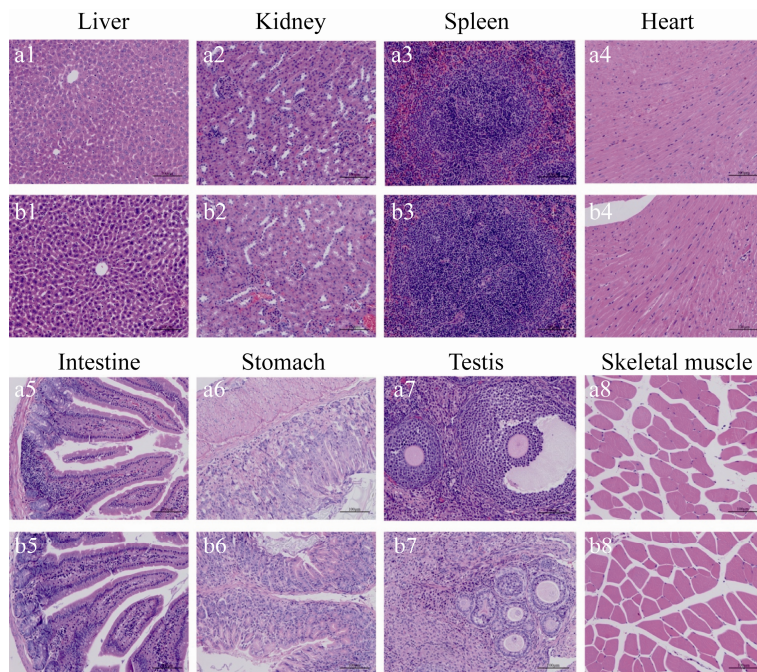


图4 在28 d亚慢性毒性试验中粘细菌EGB菌体及其细胞培养发酵液对雄鼠主要器官组织结构的影响
Figure 4 Effect of *Coralloccoccus* sp. strain EGB and its ferments on histological structure of main organs in female mice in 28-day toxicity test. a: 0 mg/(kg·d); b: 2 000 mg/(kg·d) BW ($n=10$).

根据急性毒性分级标准, 属于实际无毒物质。亚慢性毒性试验是在较长的时间范围内研究连续灌胃不同剂量的粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液, 以观察其对小鼠可能引起的有害效应、毒作用性质和靶器官, 以评估亚慢性摄入 EGB 菌体及其发酵产物的可能危害。小鼠体重变化的结果表明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液不影响小鼠的正常生长和发育。小鼠血清的生理生化指标中, ALT、AST 和 ALP 可以反映肝脏的代谢情况^[36], 本研究结果表明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液不会引起肝脏损伤, 肝脏的代谢分泌功能正常, 这也与正常的肝脏病理切片结果相一致。BUN 和 CR 表征了肾单位的功能状态, 而灌胃粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液并没有影响肾脏的排泄功能。血液中 GLU、TC 和 TG 反映了机体的血糖代谢和脂肪代谢的状态^[37], 而电解质稳态则由 TP、TBIL、K、Ca、Cl 和 P 来表征^[38], 本研究结果表明小鼠机体的代谢过程不受 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的影响。小鼠的肝脏、脾脏、肾脏、心脏、睾丸、卵巢、肾上腺、胸腺、小肠、胃、骨骼肌对小鼠营养物质的消化、代谢和吸收功能、免疫功能、生殖功能、血液循环功能都具有重要作用^[39]。从小鼠的器官指数和组织病理切片结果来看, EGB 菌体及其细胞培养发酵液不会造成有害物质在主要组织和器官中的沉积, 也不会影响主要组织和器官的形态和结构。因此, 本研究从亚慢性摄入的角度证明, EGB 菌体及其细胞培养发酵液对小鼠是安全无毒的。孙亚芳^[40]研究了具有抑制腐败菌生长特性的芽孢杆菌的亚慢性毒性分析试验, 研究结果表明 28 d 的喂养试验中, 芽孢杆菌对小鼠的体重增长和采食量无显著性影响, 属于无毒级别。唐萍等^[41]研究了具有广谱抗菌作用的贝莱斯芽孢杆菌 DJB5 的生物安全性, 结果表

明 DJB5 菌体及其发酵液对小鼠眼和皮肤无刺激性、无溶血性, 灌胃 DJB5 菌体及其发酵液 14 d 后对小鼠脏器、体重和血液生化指标无显著影响, 表明 DJB5 菌体及其发酵液具有较高的生物安全性。以上结果与本研究中粘细菌 EGB 的结果较为一致。

前期试验表明, 粘细菌 EGB 对稻瘟孢子萌发抑制率达到 75%^[27], 在田间喷洒粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液可直接起到控制稻瘟病的作用。此外, 粘细菌 EGB 通过分泌具有抗真菌活性的 β -1,6-葡聚糖酶和 β -1,3-葡聚糖酶以及不同类型的淀粉水解酶等^[23,25,27,31], 在多糖转化等方面具有重要的应用潜力。因此本文采用粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液混合的形式, 模拟了 EGB 生物防治和生物转化过程中的实际施用方式。粘细菌 EGB 作为生防菌剂的实际使用量小于本研究中所设置的剂量, 表明其环境施用的生物安全性。此外, 在黄瓜盆栽试验中, 发现粘细菌 EGB 对黄瓜植株的生长具有明显的促进作用。此外, 经粘细菌 EGB 处理后, 土壤中的细菌微生物群落结构显著改变, 其中 18 种生防微生物的丰度显著性上升^[29]。这些结果表明, 粘细菌 EGB 在病害控制过程中, 对宿主无负面影响, 且对土壤中有益微生物的群落结构和丰度起到上调的调控作用, 这为粘细菌 EGB 的环境安全性提供了间接的依据。粘细菌 EGB 对使用环境中的其他生物, 如鱼类、昆虫类等, 是否具有慢性毒性和遗传毒性影响, 将在后续研究中加以深入探索, 以期粘细菌 EGB 在开放环境中的应用安全性提供更加全面的理论支撑。

本文研究了粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液的生物毒理安全性。粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液对 ICR 小鼠无毒、无基因突变和染色体损伤的能力。小鼠的体重变化、

采食饮水、血液学分析、器官指数和器官病理均表现正常, LD_{50} 大于 10 g/kg BW。本研究结果说明, 粘细菌 EGB 菌体及其细胞培养发酵液具有良好的生物安全性, 为基于粘细菌 EGB 的广谱抗植物真菌病害的生防菌剂研发及其应用提供直接的理论基础。

参考文献

- [1] Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 2010, 327(5967): 812–818.
- [2] Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B, Cammue BPA. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 2020, 144: 104240.
- [3] Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 2019, 3(3): 430–439.
- [4] Cooper J, Dobson H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 2007, 26(9): 1337–1348.
- [5] Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, Weisser WW, Emmerson M, Morales MB, Ceryngier P, Liira J, Tscharnkte T, Winqvist C, Eggers S, Bommarco R, Pärt T, Bretagnolle V, Plantegenest M, Clement LW, Dennis C, Palmer C, Inchausti P. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 2010, 11(2): 97–105.
- [6] Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 2017, 575: 525–535.
- [7] Mbarga JB, Begoude BAD, Ambang Z, Meboma M, Kuate J, Schiffers B, Ewbank W, Dedieu L, Hoopen GMT. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 2014, 77: 15–22.
- [8] Jaacks LM, Staimez LR. Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-related health outcomes in Asia: a systematic review. *Environment International*, 2015, 76: 57–70.
- [9] Koutros S, Silverman DT, Alavanja MC, Andreotti G, Lerro CC, Heltshe S, Lynch CF, Sandler DP, Blair A, Beane Freeman LE. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *International Journal of Epidemiology*, 2016, 45(3): 792–805.
- [10] Raanan R, Harley KG, Balmes JR, Bradman A, Lipsett M, Eskenazi B. Early-life exposure to organophosphate pesticides and pediatric respiratory symptoms in the CHAMACOS cohort. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(2): 179–185.
- [11] Skrobek A, Butt TM. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 251(1): 23–28.
- [12] Zhang CW, Zhang YQ, Gao JM. Toxicological and safety evaluation of *Bacillus subtilis* strain Tpb55. *Advanced Materials Research*, 2013, 807/808/809: 1947–1953.
- [13] Reinecke P, Andersch W, Stenzel K, Hartwig, J. BIO 1020, a new microbial insecticide for use in horticultural crops. *Proceedings of the British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 1990, 1: 49–54.
- [14] 陈源. 微生物农药对鱼类安全性测试方法及影响研究. 南京信息工程大学学位论文, 2013.
- [15] AIGburi A, Volski A, Cugini C, Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, Bren AB, Dicks LMT, Chikindas ML. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 2016, 6(6): 432–452.
- [16] Nasir MN, Besson F. Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 387(1): 187–193.
- [17] Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(1): 70–102.
- [18] 李周坤. *Corallocooccus* sp. EGB 来源的糖苷水解酶的鉴定及其生物学功能研究. 南京农业大学学位论文, 2015.
- [19] Cao PB, Dey A, Vassallo CN, Wall D. How myxobacteria cooperate. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(23): 3709–3721.
- [20] Keane R, Berleman J. The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology: Reading, England*, 2016, 162(1): 1–11.
- [21] Herrmann J, Hüttel S, Müller R. Discovery and biological

- activity of new chondramides from *Chondromyces* sp.. *ChemBioChem*, 2013, 14(13): 1573–1580.
- [22] Wenzel SC, Müller R. Myxobacteria—‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Molecular BioSystems*, 2009, 5(6): 567.
- [23] Chen XP, Zhang L, Li X, Qiao Y, Zhang YJ, Zhao YQ, Chen J, Ye XF, Huang Y, Li ZK, Cui ZL. Impact of maltogenic α -amylase on the structure of potato starch and its retrogradation properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 325–331.
- [24] Zhou J, Li ZK, Zhang H, Wu JL, Ye XF, Dong WL, Jiang M, Huang Y, Cui ZL. Novel maltogenic amylase *CoMA* from *Coralloccoccus* sp. strain EGB catalyzes the conversion of maltooligosaccharides and soluble starch to maltose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(14): e00152-18.
- [25] Li ZK, Wu JL, Zhang BY, Wang F, Ye XF, Huang Y, Huang Q, Cui ZL. AmyM, a novel maltohexaose-forming α -amylase from *Coralloccoccus* sp. strain EGB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 1977–1987.
- [26] Li ZK, Ye XF, Chen PL, Ji K, Zhou J, Wang F, Dong WL, Huang Y, Zhang ZG, Cui ZL. Antifungal potential of *Coralloccoccus* sp. strain EGB against plant pathogenic fungi. *Biological Control*, 2017, 110: 10–17.
- [27] Li ZK, Ye XF, Liu MX, Xia CY, Zhang L, Luo X, Wang T, Chen Y, Zhao YQ, Qiao Y, Huang Y, Cao H, Gu XY, Fan JQ, Cui ZL, Zhang ZG. A novel outer membrane β -1,6-glucanase is deployed in the predation of fungi by myxobacteria. *The ISME Journal*, 2019, 13(9): 2223–2235.
- [28] Ye XF, Chen Y, Ma SY, Yuan T, Wu YX, Li YX, Zhao YQ, Chen SY, Zhang YW, Li LY, Li ZK, Huang Y, Cao H, Cui ZL. Biocidal effects of volatile organic compounds produced by the myxobacterium *Corralloccoccus* sp. EGB against fungal phytopathogens. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103502.
- [29] Ye XF, Li ZK, Luo X, Wang WH, Li YK, Li R, Zhang B, Qiao Y, Zhou J, Fan JQ, Wang H, Huang Y, Cao H, Cui ZL, Zhang RF. A predatory myxobacterium controls cucumber *Fusarium* wilt by regulating the soil microbial community. *Microbiome*, 2020, 8(1): 49.
- [30] 陈源, 卜元卿, 单正军. 微生物农药研发进展及各国管理现状. *农药*, 2012, 51(2): 83–89.
Chen Y, Bu YQ, Shan ZJ. Reviews on development and management of microbial pesticide in different countries. *Agrochemicals*, 2012, 51(2): 83–89. (in Chinese)
- [31] Zhou J, Li ZK, Wu JL, Li LF, Li D, Ye XF, Luo X, Huang Y, Cui ZL, Cao H. Functional analysis of a novel β -(1,3)-glucanase from *Coralloccoccus* sp. strain EGB containing a fascin-like module. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(16): 1016–1023.
- [32] 庄敬华, 陈捷, 杨长成, 高增贵, 刘限, 牟连晓, 郑雅楠. 生防木霉菌生物安全性评价. *中国农业科学*, 2006, 39(4): 715–720.
Zhuang JH, Chen J, Yang CC, Gao ZG, Liu X, Mu LX, Zheng YN. Evaluation of biocontrol *Trichoderma* on biology security. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 715–720. (in Chinese)
- [33] Yang PZ, Zhu XX, Cao LL, Zheng Z, CHENG JS, Jiang ST. Toxicological assessment of *Bacillus thuringiensis* 29.118 isolated from Chouguiyu, a traditional Chinese fermented fish product. *Food Science*, 2019, 40(3): 186–193.
- [34] Jonker D, Hasselwander O, Tervilä-Wilo A, Tenning PP. 28-day oral toxicity study in rats with high purity barley beta-glucan (GlucageTM). *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(1): 422–428.
- [35] 曹向宇. 麦麸多肽的制备及生物活性的研究. 沈阳农业大学学位论文, 2009.
- [36] Zheleva-Dimitrova D, Simeonova R, Gevrenova R, Savov Y, Balabanova V, Nasar-Eddin G, Bardarov K, Danchev N. *In vivo* toxicity assessment of *Clinopodium vulgare* L. water extract characterized by UHPLC-HRMS. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 134: 110841.
- [37] Chen SN, Chang CS, Chen S, Soni M. Subchronic toxicity and genotoxicity studies of *Antrodia* mushroom β -glucan preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2018, 92: 429–438.
- [38] Janaki B, Sashidhar RB. Subchronic (90-day) toxicity study in rats fed gum Kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Food and Chemical Toxicology*, 2000, 38(6): 523–534.
- [39] 修爱慧. 土壤杆菌 ZX09 胞外多糖的制备和结构解析以及生物学功能的研究. 南京理工大学学位论文, 2011.
- [40] 孙亚芳. 拮抗芽孢杆菌在枇杷采后保鲜中的应用及抑菌机制初探. 浙江大学学位论文, 2018.
- [41] 唐萍, 代飞燕, 吴毅歆, 叶敏, 何月秋. 贝莱斯芽孢杆菌 DJB5 的生物安全性评价. *南方农业学报*, 2019, 50(12): 2720–2727.
Tang P, Dai FY, Wu YX, Ye M, He YQ. Biosafety evaluation of *Bacillus velezensis* DJB5. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(12): 2720–2727. (in Chinese)

(本文责编 李磊)