

均为革兰氏阴性极生鞭毛的杆状细菌,不发酵葡萄糖产酸,接触酶阳性,硝酸盐还原阴性,由此可确认为 *Pseudomona*。进一步分析发现这些菌株均可产生黄绿色荧光色素,细胞内无PHB积累,无精氨酸双水解酶活性,其中108、158、192号菌株具有微弱的氧化酶活性,在蔗糖培养基上不产生粘液并根据其碳源利用特点,可推测它们为 *P.cichorii*; 126、130、209号菌株氧化酶阳性,在蔗糖培养基上产生粘液,且具有表3所示的碳源谱,可推测它们为 *P.syringae*; 另外76号菌株无PHB积累,不产生荧光,菌落红色,具有微弱的硝酸盐还原活性,由此可推测其为 *P.stutzeri*。59、77、172、203号菌株在肉汁胨平板上的菌落为白色,革兰氏染色阴性,周生鞭毛,除95号菌株可形成菌胶团外,其余为单细胞的杆状细菌,它们发酵葡萄糖产酸不产气,接触酶阳性,氧化酶阴性,由此确认为 *Erwinia*。其中59、77、172号菌株苯丙氨酸脱羧酶阳性,可液化明胶,具微弱的硝酸盐还原活性,结合碳源利用试验结果推测它们属于 *E.herbicola*; 203号菌株在蔗糖平板上可形成光滑粘液状菌落,不能以乳糖、木糖和鼠李糖为唯一碳源,推测这一菌株属于 *E.tracheiphila*。55、131、206号菌株在肉汁胨平板上的菌落为黄色,杆状、革兰氏染色阴性,极生鞭毛,不发酵葡萄糖,不还原硝酸盐,氧化酶阴性,由此可确认为 *Xanthomonas*。根据这些菌株具有脲酶活性和表3所示的碳源利用谱,可推测它们属于 *X.ampelina*。

3 结论

3.1 本试验进一步证实了前人的研究结果,即冰核活性菌广泛分布于自然界植物的叶表面,其分布频率与植物的类别和生态环境有关。

3.2 对冰核活性较高的14株细菌进行了常规的鉴定,推测它们属于3个属6个种,分别是 *P.cichorii* *P.syringae* *P.stutzeri* *E.herbicola* *E.tracheiphila* *X.ampelina*, 准确的分类地位需与各已知种标准菌株进行DNA同源性

分析后确定。

参考文献

- 1 Tsumuki,H,et al. Identification of ice-nucleation active fungus isolated from the gut of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) and a search for ice-nucleating active *Fusarium* species. *Annals of the Phytopathological society of Japan* 1995,61(4):334~339.
- 2 Pouleur,S,et al. Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum* *Applied and Environmental Microbiology*,1992,58(9):2960~2964.
- 3 Gurian,S.D.Lindow S.W. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis *FASEB Journal*,7(14):1338~1343.
- 4 Dawn,A et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in plant *Plant physiology*,1992,100:1730~1736.
- 5 孙福在等. 影响冰核细菌成冰活性的因素研究. *中国农业科学*, 1991, 24(3): 57~64.
- 6 Vali,G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogenous freezing of supercooled liquids. *Journal atmosphere science*,1971,28:402~409.
- 7 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- 8 Buchanan,R.E.Gibbons N.E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (8th edition). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974, 274~323. 462~474.
- 9 Buchanan,R.E.Gibbons N.E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th edition). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1989, 162~189. 201~205. 472~485.

富硒茶提高大鼠非特异性免疫功能的效应

胡秋辉 陈晓红 安辛欣 吕兴泉 南京农业大学食品科技学院 210065

摘要 利用土壤-植物系统的富硒营养原理和技术,在低硒土壤茶园施用富硒茶专用生物制剂,生产富硒茶叶,研究富硒茶叶对大鼠非特异性免疫功能的影响。结果表明:大鼠饮用富硒茶和补充 Na_2SeO_3 能显著提高大鼠血液和肝组织的含硒量,饮用富硒茶大鼠的吞噬细胞是对照的6.2倍,低硒茶叶的1.4倍;吞噬指数是对照的2.1倍, Na_2SeO_3 的1.4倍。富硒茶显著提高大鼠体内吞噬细胞和吞噬指数,增强机体的非特异性免疫功能,在等量硒条件下,富硒茶中硒的生物有效性高于无机硒 Na_2SeO_3 。

关键词 富硒茶 血液含硒量 肝组织含硒量 吞噬指数 免疫功能

Abstract By means of new organic selenium plant biotechnology, Se-enriched tea was developed by fertilization in soil or foliar spraying of selenium in soil-plant system. An animal test was carried out. The rats were fed both a selenium-deficient basal diet, supplemented with water, sodium

selenite, extraction of low Se tea and a diet with Se-enriched tea respectively. The results showed that selenium contents in blood and liver were significantly increased in rats fed with extraction of Se-enriched tea and sodium selenite compared with that of low Se tea extraction and water. The higher efficacy was produced by selenium in Se-enriched tea. The significant difference was obtained in rat phagocytic cell percentage and phagocytic index in rats fed with Se-enriched tea and sodium selenite in comparison with that fed with low Se water. Se-enriched tea could improve rat immune efficacy and be used as a good source for raising animals and human selenium intake.

Key words Se-enriched tea Se content of blood Se content of liver Phagocytic index Immunity function

土壤缺硒是世界上广泛存在的问题,我国除湖北恩施、陕西紫阳两地是天然富硒地区外,全国有72%国土为不同程度的缺硒区,这些地区约有一亿多人中的膳食结构中硒含量不足,造成人体低硒状态^[1,2]。硒与人类疾病、健康的关系一直是国内外生物学和医学研究的热点问题^[3],已有的成果表明,人体的克山病、大骨节病、癌症、心脑血管疾病、糖尿病、不育症、机体免疫力减退和衰老过程等40余种疾病均与缺硒有关。最近的研究还揭示了艾滋病人的恶性特征是体内硒缺耗,硒具有解除重金属中毒等新的生理功能^[4,5]。美国学者提出硒化学防癌新战略,即通过生物转化和有机硒化合物的开发来开发有机硒源^[6,7]。我国13个省市的营养调查表明,成人每日的摄硒量仅26.63 μg,与中国营养学会推荐日最低摄入量50 μg,国际硒学会推荐日最低摄入量60 μg相差甚远,仅靠天然食物中的硒不足以满足人体的正常需要,但亚硒酸钠等无机硒的毒性高,依靠生物转化技术获取植物有机硒,开发高效安全的补硒食品势在必行^[8]。特别是在当今癌症等诸多疾病无特效良药的时候,通过摄取足够的硒来预防各种疾病的发生显得尤为重要。茶树是富硒能力较强的植物,茶叶中的硒多为有机硒,是理想的补硒资源^[9,10]。本研究利用土壤—茶树系统的富硒营养技术,通过茶树开发安全、高效具有补硒功能的茶叶产品,研究富硒茶叶对大鼠非特异性免疫功能的影响,为富硒茶的有效利用和保健功能提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 富硒茶叶的制备

试验茶园选在江苏宜兴市街前茶场,茶园面积5hm²,土壤含硒量为0.141 μg/g,土壤水溶性硒为0.010 μg/g,于1998年7月10日叶面喷施富硒茶专用生物制剂,含亚硒酸钠200g/hm²,溶液Se浓度为100mg/L,喷施后第12d采摘一芽二叶茶叶,按当地制茶工艺生产绿茶,茶叶含硒量为1.14 μg/g,有机硒

81.82%,供动物实验用。同时采摘相同条件未喷施硒肥茶园的茶叶作为对照,茶叶含硒量为0.096 μg/g,有机硒86.42%。

1.2 天然富硒茶叶的采集

在湖北恩施市芭蕉区的天然富硒茶园采摘茶叶,与低硒茶园生产的富硒茶叶一样的程序,作为天然富硒茶叶供试验之用,茶叶含硒量2.62 μg/g,有机硒84.65%。

1.3 样品硒含量的测定

土壤全硒和水溶性硒,茶叶、饲料和大鼠的血液和肝组织含硒量的测定采用H₂SO₄-HNO₃-HClO₄混合酸消化至终点,1:1NH₃·H₂O中和至pH1.5~2.0,溶液中的硒用2,3-二氨基萘(DAN)荧光分光光度法测定。

1.4 富硒茶叶的动物试验方法

实验动物用平均体重约140g的SD大鼠40只,基础饲料配方为面粉12%,黄豆粉10%,米粉76%,混合无机盐1%,混合维生素1%,基础饲料含硒量为0.01 μg/g。设5组处理,分别以不同的硒水平水溶液为大鼠饮料。制备茶叶提取液时,分别取富硒茶叶及普通低硒茶叶10g,用开水200ml冲泡,搅拌15min,冷却,

表1 大鼠喂饲实验方案

处理	基础饲料+饮用硒源	饮水含硒量 (μg/ml)
对照	基础饲料+自来水(对照)	未测出
亚硒酸钠	基础饲料+亚硒酸钠溶液	0.024
低硒茶叶	基础饲料+低硒茶叶提取液	0.005
宜兴富硒茶叶	基础饲料+富硒茶叶提取液	0.025
恩施富硒茶叶	基础饲料+富硒茶叶提取液	0.024

过滤,倒入饮水瓶中供大鼠饮用,试验处理见表1。实验4周后,测定大鼠的血液和肝组织的含硒量。

1.5 吞噬细胞数及吞噬指数的测定

选SD雄性大鼠40只,随机分成5组,每组8只。饲养4周后,腹腔注射20%的新鲜鸡红细胞悬液1ml/只,间隔30min,颈椎脱臼处死大鼠,仰位固定,正中剪开腹腔壁皮肤,经腹腔注入生理盐水2ml,用手挤压

腹部两侧,使生理盐水与腹腔液充分混匀,吸出腹腔液 1ml 滴于载玻片上,放入垫有湿纱布的带盖培养皿内,移至 37℃ 温箱培育 30min,然后,放入生理盐水中漂洗,晾干,以 1:1 (v/v) 甲醇丙酮固定,4% (v/v) Giemsa-磷酸盐缓冲液染色 30min,再用蒸馏水漂洗,晾干,用显微镜在油镜下计数 100 个吞噬细胞及其中吞噬鸡红细胞的吞噬细胞数,计算吞噬细胞百分率和吞噬指数。

2 结果与讨论

表 2 茶硒对大鼠血液和肝脏硒含量的影响

喂料处理	血液含硒量 (μg/ml)	肝脏含硒量 (μg/g)
对照 (CK)	0.053±0.011 ^a	0.423±0.101 ^a
亚硒酸钠	0.129±0.028 ^b	1.043±0.158 ^b
低硒茶叶	0.095±0.080 ^a	0.499±0.114 ^a
宜兴富硒茶叶	0.132±0.037 ^b	1.188±0.289 ^b
恩施富硒茶叶	0.136±0.036 ^b	1.211±0.297 ^b

同一列中标注不同小写字母表示处理之间相互比较间差异显著 (p<0.05)

2.1 富硒茶对大鼠血液、肝组织硒水平的影响

动物血硒与其饲料硒的摄入量存在正相关,肝脏是动物体内最大的硒储存库,其储存量是随硒摄入量的多少而变化,因此,肝硒和血硒是一个重要的短期体硒有效指标。表 2 的结果表明,大鼠饮自来水和低硒茶浸提液这两个处理的血液和肝脏含硒量均低于饮 Na₂SeO₃ 溶液和富硒茶茶浸提液。对照和低硒茶喂养大鼠的血液含硒量分别为 0.053 μg/ml 和 0.095 μg/ml。Na₂SeO₃ 和富硒茶处理大鼠的血液含硒量分别为 0.129 和 0.36 μg/ml。肝脏的含硒量对照和饮低硒茶处理分别为 0.443 和 0.499 μg/g。富硒茶处理的大鼠肝脏含硒量可达 1.188~1.211 μg/g Na₂SeO₃ 处理为 1.043 μg/g,均为显著差异。故饮用富硒茶和补充 Na₂SeO₃ 能显著提高大鼠血液和肝脏的含硒量。而相同硒量条件下,富硒茶对提高血硒和肝脏硒含量的效果优于 Na₂SeO₃。

2.2 富硒茶叶对大鼠非特异性免疫功能的影响

硒是动物的重要免疫元素,动物体内的吞噬细胞是重要的免疫细胞,它的免疫功能是吞噬和杀伤病菌。因此,吞噬细胞是机体免疫的第一道防线。表 3 结果表明,饮用富硒茶组大鼠的吞噬指数是对照组大鼠的 2.1 倍,Na₂SeO₃ 处理的 1.13 倍,低硒茶处理的 1.58

表 3 富硒茶对大鼠腹腔吞噬细胞吞噬功能的影响

喂料处理	大鼠数	吞噬细胞%	吞噬指数
对照 (CK)	8	6.84±3.14A	10.32±7.41a
亚硒酸钠	8	9.78±4.80B	19.26±8.31b
低硒茶叶	8	8.38±5.21C	13.74±8.72c
宜兴富硒茶叶	8	11.79±5.65B	21.66±8.82b
恩施富硒茶叶	8	13.57±4.97B	21.78±9.05b

同一列中标注不同小写字母表示处理之间相互比较间差异显著 (p<0.05)

同一列中标注不同小写字母表示处理之间相互比较间差异显著 (p<0.01)

倍。饮用富硒茶大鼠的吞噬细胞百分数是对照组的 1.8 倍,Na₂SeO₃ 处理的 1.3 倍,低硒茶处理的 1.4 倍。饮富硒茶组吞噬细胞百分率和吞噬指数与对照组和低硒茶组相比差异显著,而且效果优于亚硒酸钠组,两种富硒茶之间无显著差异,说明富硒茶可提高大鼠吞噬细胞数量,增强吞噬细胞的吞噬能力,具有促进机体免疫,加强大鼠的非特异性免疫功能。

参考文献

- 1 陈铭,刘更另.高等植物的硒营养及在食物链中的作用.土壤通报,1996,27(4):185~188.
- 2 布和敖斯尔.土壤硒区域环境分异及安全阈值的研究.土壤学报,1995,32(2):186~193.
- 3 陈必链,黄健.我国富锌和富硒功能食品研究现状.食品研究与开发,1999,20(2):22~37.
- 4 Schrauzer G N.Meginness J E.Observations on human selenium supplementation,Trace Subst Environ Health,1978,13:64~82.
- 5 Wanger P D.Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis.J.Trace Elem. Electrolytes Health Dis,1992,6:209~215.
- 6 Umesh C,WINTER k.Selenium content of barley as influenced by selenite and selenate enriched fertilizers.Commun. Soil Sci.Plant Anal,1993,24:1165~1170.
- 7 Georg A.Effect of supplementation of fertilizers on human Se status in Finland.Analyst,1995,120(3):841~843.
- 8 吴军,刘秀芳,徐汉生.硒在植物生命活动中的作用.植物生理学通讯,1999,35(5):417~423.
- 9 胡秋辉,潘根兴,丁瑞兴.低硒土壤茶园茶叶富硒方法及其富硒效应.南京农业大学学报,1999,22(3):91~94.
- 10 胡秋辉,潘根兴,丁瑞兴.富硒茶硒的浸出率及化学性质研究.中国农业科学,1999,32(5):69~72.