

2 株海洋红酵母突变菌株对小鼠的毒性试验

刘影, 谢为天, 吴娟, 徐春厚* (广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的] 研究 2 株海洋红酵母突变菌株对小鼠的急性毒性。[方法] 将 42 只小鼠随机分为 7 组, 试验组①、②和③小鼠灌服胶红酵母 J6-82 菌悬液, 试验组④、⑤和⑥小鼠灌服粘红酵母 J2-75 菌悬液, 细菌数量分别为 1×10^7 、 1×10^9 和 1×10^{11} 个/mL, 对照组小鼠灌服灭菌的红酵母培养基, 研究胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 对小鼠的急性毒性。[结果] 42 只小鼠临床健康, 无发病和死亡, 无病理解剖学变化; 试验组小鼠的平均体质量、饮水量、脏器指数与对照组相比无显著差异, 淋巴细胞总数、淋巴细胞比率与对照组相比差异显著; 试验组小鼠肝脏组织切片无病理组织学变化。[结论] 胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 对小鼠无急性毒性。

关键词 胶红酵母 J6-82; 粘红酵母 J2-75; 毒性试验; 小鼠

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)04-0073-04

Toxicity Test of Two Mutation Strains of Marine *Rhodotorula* on Mice

LIU Ying, XIE Wei-tian, WU Juan et al (College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To study the acute toxicity of two mutation strains of marine *Rhodotorula* on mice. [Method] 42 mice were randomly divided into 7 groups. Mice in test group ①, ②, ③ were fed with *Rhodotorula mucilaginosa* J6-82 bacteria suspension with the bacteria number of 1×10^7 , 1×10^9 and 1×10^{11} ind./mL respectively. Mice in test group ④, ⑤, ⑥ were fed with *Rhodotorula glutinis* J2-75 with bacteria number of 1×10^7 , 1×10^9 , 1×10^{11} ind./mL respectively. The mice in control group were fed with sterilized red yeast culture medium. The acute toxicity of *R. mucilaginosa* J6-82 and *R. glutinis* J2-75 on mice were studied. [Result] 42 mice were clinical healthy, there was no incidence of death or pathological changes. There was no significant difference between the control group and test groups in average body mass, drinking water amount, organ index of mice, but total lymphocyte count and lymphocyte ratio had significant differences between test groups and control group. There was no histopathological change in liver tissue of mice in test groups. [Conclusion] *Rhodotorula mucilaginosa* J6-82 and *Rhodotorula glutinis* J2-75 had no acute toxicity on mice.

Key words *Rhodotorula mucilaginosa* J6-82; *Rhodotorula glutinis* J2-75; Toxicity test; Mice

海洋红酵母是指存在于海洋环境及海洋生物中的单细胞真核微生物。国外研究表明, 在深海火山以及一些受污染海域、太平洋、印度西南海岸、南极等不同的海域中, 红酵母均为优势菌群^[1-5]。海洋红酵母富含蛋白质、氨基酸、脂肪酸、类胡萝卜素、虾青素、消化酶、维生素、核苷酸等, 具有较高的营养价值和活性作用, 可作为食品添加剂、功能生物饲料、抗氧化剂、微生物拮抗剂及着色剂等应用^[6-10]。

海洋红酵母作为微生态制剂应用时, 能显著提高水产动物幼苗的存活率, 提高饲料效果和饲料报酬, 并能增强动物体的免疫功能, 减少抗生素用量, 是生态养殖的优良添加剂^[11]。摄食添加海洋红酵母饲料的水产动物具有抗病能力强、存活率高、皮肤和肌肉色泽鲜艳、口味好等特点^[12]。在海洋红酵母中, 胶红酵母和粘红酵母是南海近岸海域的优势种群^[6,13], 含有类胡萝卜素、虾青素、消化酶、维生素等活性物质, 是具有较高开发价值的益生菌株^[6]。笔者选用的胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 是从雷州半岛近岸海域分离鉴定和诱变选育的 2 株海洋红酵母突变菌株, 具有营养要求简单、繁殖速度快、易培养、类胡萝卜素和虾青素产量高等优点, 具有潜在的应用价值和广阔的开发前景, 故有必要对其进行急性毒性试验, 以期为今后将其作为益生菌株的开发应用奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 菌株 胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75, 由广东海

基金项目 广东省科技计划项目(2013B020307013); 广东省科技计划项目(2017A02021); 湛江市科技计划项目(2015B01013)。

作者简介 刘影(1991—), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向: 动物微生物学与免疫学研究。* 通讯作者, 教授, 硕士, 从事动物微生物学与免疫学研究。

收稿日期 2017-11-30

洋大学预防兽医学实验室分离鉴定、诱变选育和保存。

1.2 试验动物 42 只 SPF 级昆明(KM)小鼠, 体质量为 28~30 g, 购于广东医学院实验动物中心。

1.3 培养基

1.3.1 红酵母培养基。 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, NaCl 20 g/L, pH 自然。

1.3.2 红酵母琼脂培养基。 在红酵母培养基中加入琼脂粉 20 g/L, pH 自然。

1.4 2 株红酵母菌悬液的制备 分别将胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 划线接种于红酵母琼脂培养基平板, 28 ℃ 下培养 72 h, 用灭菌生理盐水刮下红酵母菌苔, 置于带玻璃珠的三角瓶中振荡, 用灭菌纱布过滤; 使用血球计数板计数红酵母的菌体细胞数量, 配制成细菌数量分别为 1×10^7 、 1×10^9 和 1×10^{11} 个/mL 的菌悬液。

1.5 毒性试验

1.5.1 动物试验设计。 将 42 只小鼠随机分成 7 组, 分别为试验组(①、②、③、④、⑤、⑥)和对照组, 每组 6 只, 公母各半, 逐只称重; 试验组①、②、③小鼠灌服胶红酵母 J6-82 菌悬液, 细菌数量分别 1×10^7 、 1×10^9 和 1×10^{11} 个/mL; 试验组④、⑤、⑥小鼠灌服粘红酵母 J2-75 菌悬液, 细菌数量分别为 1×10^7 、 1×10^9 和 1×10^{11} 个/mL; 对照组小鼠灌服灭菌的红酵母培养基; 试验小鼠连续灌服 14 d, 每天 1 次, 0.5 mL/只; 灌服前后分别禁食 8 和 2 h, 不禁水, 每天对小鼠进行称重和一般性观察; 第 15 天, 对小鼠进行血常规测定、脏器指数测定、病理解剖学观察及肝脏组织切片观察。

1.5.2 测定项目与方法。 试验开始后, 每天上午、下午各观察 1 次, 详细记录小鼠的外观体征、采食饮水、中毒症状及死

亡情况;小鼠在每天灌胃前逐只称重,记录重量;详细记录每组小鼠的饮水量。

(1)小鼠血常规测定。试验开始后的第15天(提前12 h禁食),每组随机取3只小鼠,摘眼球取血,将血液滴入装有EDTAIC2抗凝剂的真空采血管中,取血样约100 μ L,使用BC-3000全自动三分群血细胞分析仪进行血常规分析检测。

(2)小鼠病理解剖学观察及脏器指数测定。试验开始后的第15天(提前12 h禁食),每组取3只小鼠,脱颈椎处死小鼠并将其解剖,观察有无病变器官,剥离心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏等脂肪和筋膜后称重,用于测定小鼠脏器指数。

(3)小鼠病理组织学观察。将用于小鼠血常规测定的14只(每组取2只)小鼠的肝脏制成病理组织切片,用4%甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,使用光学

显微镜观察。

1.6 数据处理 试验数据用平均值 \pm 标准差表示,使用SAS 8.2统计软件对试验数据进行单因子方差分析,差异显著时进行Duncan's多重极差比较, $P < 0.05$ 表示差异显著性。

2 结果与分析

2.1 小鼠一般体征的观察 将2株红酵母的菌悬液分别按3个不同浓度灌服小鼠,连续观察14 d,发现所有小鼠均表现为健康活泼的正常状态,采食和饮水正常,无发病和死亡现象。

2.2 小鼠体质量的变化 由表1可知,与对照组相比,各试验组小鼠平均体质量呈增加趋势,但差异不显著($P > 0.05$),各试验组间小鼠平均体质量亦无显著差异($P > 0.05$)。

表1 各组小鼠平均体质量的变化

Table 1 The average body mass changes of mice in each group

组别 Group	时间 Time//d							
	0	1	2	3	4	5	6	7
试验组① Test group ①	28.53 \pm 0.60	28.83 \pm 1.23	29.16 \pm 0.98	29.56 \pm 0.98	29.98 \pm 1.35	30.32 \pm 1.11	30.67 \pm 0.91	30.99 \pm 0.73
试验组② Test group ②	29.09 \pm 0.89	29.56 \pm 1.13	30.05 \pm 1.05	30.05 \pm 1.05	30.85 \pm 1.56	31.02 \pm 1.23	31.85 \pm 1.31	32.45 \pm 2.32
试验组③ Test group ③	28.99 \pm 1.01	29.44 \pm 0.83	29.94 \pm 0.94	29.94 \pm 0.94	30.67 \pm 1.07	30.89 \pm 0.98	31.32 \pm 1.69	31.87 \pm 2.01
试验组④ Test group ④	29.73 \pm 0.84	29.64 \pm 0.93	29.73 \pm 0.84	30.35 \pm 0.97	30.68 \pm 1.35	31.02 \pm 1.89	31.67 \pm 0.91	31.99 \pm 0.83
试验组⑤ Test group ⑤	29.91 \pm 0.73	30.45 \pm 1.22	30.67 \pm 1.07	31.05 \pm 1.13	31.55 \pm 1.56	31.92 \pm 1.03	32.65 \pm 1.056	33.05 \pm 1.32
试验组⑥ Test group ⑥	29.84 \pm 1.35	30.56 \pm 1.32	31.43 \pm 0.97	31.87 \pm 0.84	32.43 \pm 1.07	32.89 \pm 1.55	33.05 \pm 1.67	33.68 \pm 2.21
对照组 Control group	29.48 \pm 1.32	29.88 \pm 0.88	30.28 \pm 1.21	30.28 \pm 1.21	30.64 \pm 1.20	30.87 \pm 0.78	31.34 \pm 1.22	31.64 \pm 1.45

组别 Group	时间 Time//d						
	8	9	10	11	12	13	14
试验组① Test group ①	31.32 \pm 0.67	31.68 \pm 1.52	31.97 \pm 2.37	32.33 \pm 2.50	32.93 \pm 1.53	33.85 \pm 1.74	34.28 \pm 1.54
试验组② Test group ②	32.87 \pm 1.63	33.32 \pm 1.24	33.87 \pm 1.08	34.09 \pm 1.80	34.68 \pm 2.05	35.02 \pm 1.57	35.78 \pm 2.35
试验组③ Test group ③	32.25 \pm 1.35	32.85 \pm 1.65	33.09 \pm 1.58	33.84 \pm 0.86	34.23 \pm 0.87	34.97 \pm 1.25	35.54 \pm 1.63
试验组④ Test group ④	32.32 \pm 1.67	32.68 \pm 2.52	33.27 \pm 2.37	33.88 \pm 1.50	34.33 \pm 1.63	34.85 \pm 1.74	35.08 \pm 1.43
试验组⑤ Test group ⑤	33.87 \pm 2.63	34.32 \pm 1.24	34.87 \pm 1.09	35.09 \pm 2.23	35.68 \pm 1.05	36.12 \pm 1.58	36.78 \pm 2.35
试验组⑥ Test group ⑥	34.05 \pm 1.38	34.55 \pm 1.67	34.89 \pm 1.52	35.04 \pm 0.86	35.83 \pm 1.87	36.07 \pm 1.15	36.84 \pm 1.63
对照组 Control group	31.96 \pm 1.37	32.25 \pm 1.42	32.56 \pm 2.03	32.86 \pm 1.95	33.04 \pm 1.63	33.45 \pm 1.67	33.83 \pm 2.43

2.3 小鼠饮水量的变化 从图1可以看出,与对照组相比,各试验组小鼠的饮水量略有下降,但差异不显著($P > 0.05$);各试验组间饮水量亦无显著差异($P > 0.05$)。

2.4 小鼠血常规测定结果 由表2可知,各试验组小鼠的淋巴细胞比率和淋巴细胞总数均高于对照组,且存在显著差异($P < 0.05$);粘红酵母菌J2-75的淋巴细胞比率和淋巴细胞总数均高于胶红酵母J6-82,且随着灌服菌数的增多呈增加的趋势。

2.5 小鼠病理解剖学观察及脏器指数测定结果 每组取3

只小鼠进行解剖,肉眼观察各组小鼠主要脏器的形态、颜色、质地、充出血等,均未出现异常变化。由表3和表4可知,各试验组小鼠的脏器指数与对照组相比差异不显著($P > 0.05$),各组小鼠的脏器指数均在正常值范围内。

2.6 小鼠病理组织学观察 显微镜观察小鼠的肝组织切片,结果见图2。从图2可以看出,各试验组与对照组小鼠的肝组织结构一样,肝小叶结构清晰完整,中央静脉及其周围放射状排列的肝细胞间紧密联系,并且彼此连接成网状,核仁明显,胞质均匀。

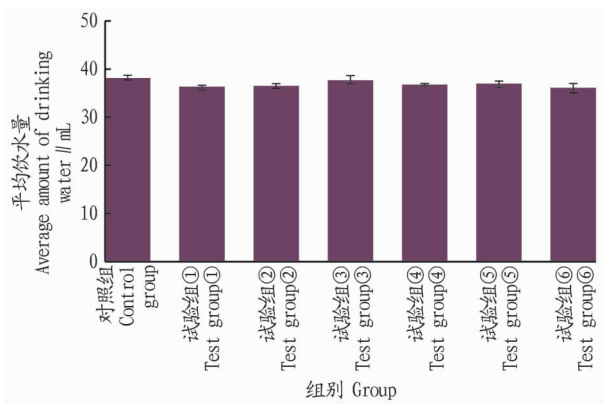


图1 各组小鼠平均饮水量的比较

Fig. 1 The comparison of the average amount of drinking water of mice among different groups

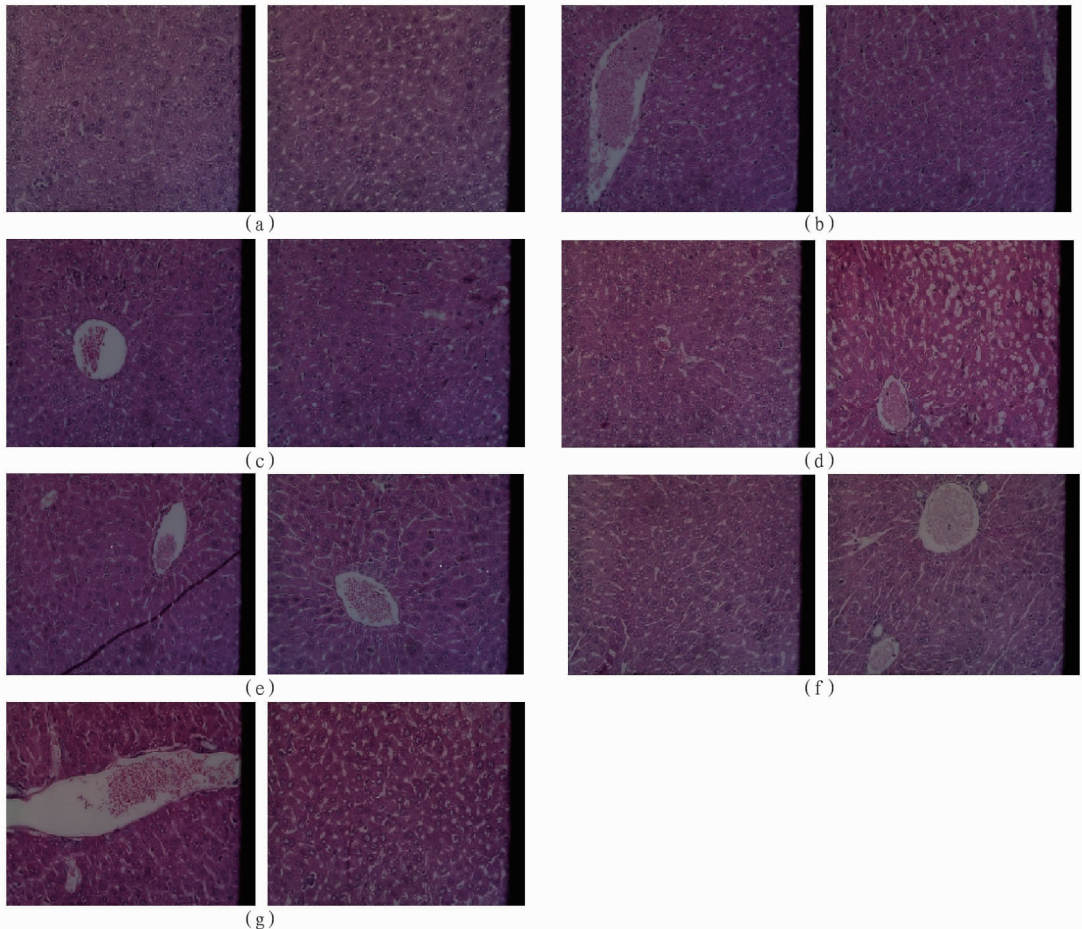
表2 各组小鼠淋巴细胞比率和淋巴细胞总数的比较

Table 2 The comparison of lymphocyte ratio and total number of lymphocytes of mice in each group

组别 Group	淋巴细胞比率 Lymphocyte ratio // %	淋巴细胞总数 Total number of lymphocytes $\times 10^9$ 个/L
试验组① Test group ①	12.33	0.73
试验组② Test group ②	11.40	0.70
试验组③ Test group ③	10.80	0.93
试验组④ Test group ④	15.27	1.07
试验组⑤ Test group ⑤	16.60	1.17
试验组⑥ Test group ⑥	18.13	1.20
对照组 Control group	9.97	0.57

表3 胶红酵母 J6-82 对小鼠脏器指数的影响 ($n=3$)Table 3 Effects of *Rhodotorula mucilaginosa* J6-82 on organ index of mice ($n=3$)

组别 Group	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肺脏 Lung	肾脏 Kidney
试验组① Test group ①	0.42 ± 0.01	4.18 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.62 ± 0.04	1.07 ± 0.02
试验组② Test group ②	0.45 ± 0.02	4.35 ± 0.11	0.33 ± 0.04	0.63 ± 0.04	1.10 ± 0.03
试验组③ Test group ③	0.44 ± 0.03	4.36 ± 0.10	0.31 ± 0.03	0.62 ± 0.02	1.08 ± 0.01
对照组 Control group	0.48 ± 0.03	4.40 ± 0.15	0.32 ± 0.06	0.60 ± 0.04	1.12 ± 0.03



注: (a). 试验组①; (b). 试验组②; (c). 试验组③; (d). 试验组④; (e). 试验组⑤; (f). 试验组⑥; (g). 对照组

Note: (a). test group ①; (b). test group ②; (c). test group ③; (d). test group ④; (e). test group ⑤; (f). test group ⑥; (g). control group

图2 各组小鼠肝组织切片观察 (400 ×)

Fig. 2 The observation of liver tissue of mice in each group (400 ×)

表4 粘红酵母 J2-75 对小鼠脏器指数的影响(n=3)

Table 4 Effects of *Rhodotorula glutinis* J2-75 on organ index of mice (n=3)

组别 Group	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肺脏 Lung	肾脏 Kidney
试验组④Test group ④	0.43 ± 0.02	4.26 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.66 ± 0.04	1.16 ± 0.02
试验组⑤Test group ⑤	0.42 ± 0.02	4.23 ± 0.10	0.29 ± 0.03	0.61 ± 0.01	1.13 ± 0.04
试验组⑥Test group ⑥	0.44 ± 0.03	4.15 ± 0.11	0.36 ± 0.04	0.60 ± 0.03	1.11 ± 0.02
对照组 Control group	0.48 ± 0.03	4.40 ± 0.15	0.32 ± 0.06	0.60 ± 0.04	1.12 ± 0.03

3 讨论

在小鼠毒性试验中,将3个不同浓度的胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 菌悬液灌服小鼠,连续灌服 14 d。在此期间,各试验组小鼠均呈健康活泼状态,无发病、死亡现象,体质量变化和饮水量正常,无病理解剖学变化;各试验组小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏指数与对照组相比无显著差异,说明 2 株红酵母对小鼠无急性毒副作用;各试验组小鼠的淋巴细胞比率和淋巴细胞总数均显著高于对照组,说明这 2 株红酵母能够增强小鼠机体的免疫力,且粘红酵母菌 J2-75 具有更强的提高免疫力的作用。

徐占利等^[14]用筛选出的胶红酵母菌株进行了急性毒性及遗传性毒性研究,采用急性经口毒性试验、Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验及小鼠精子畸形试验对胶红酵母进行安全性评价,结果表明胶红酵母菌属于安全无毒性,并且未见其遗传毒性。该试验结果亦证实了胶红酵母 J6-82 和粘红酵母 J2-75 突变菌株对小鼠无急性毒性,至于是否有遗传性毒性尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] CONNELL L, BARRETT A, TEMPLETON A, et al. Fungal diversity associated with an active deep sea volcano: Vailulu'u Seamount, Samoa [J]. *Geomicrobiology journal*, 2009, 26(8): 597-605.
- [2] HAGLER A N, MENDONCA-HAGLER L C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of rio de janeiro,

- Brazil [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1981, 41(1): 173-178.
- [3] PRABHAKARAN N, GUPTA R. Yeasts from the sediment samples of the EEZ along the southwest coast of India [J]. *Journal of the marine biological association of India*, 1991, 33(1/2): 455-459.
- [4] YAMASATO K, GOTO S, OHWADA K, et al. Yeasts from the Pacific Ocean [J]. *Journal of general and applied microbiology*, 1974, 20(5): 289-307.
- [5] ZHANG X, HUA M X, SONG C L, et al. Occurrence and diversity of marine yeasts in Antarctica environments [J]. *Journal of ocean university of China*, 2012, 11(1): 70-74.
- [6] 叶伟庆, 吴园园, 高上吉, 等. 4 株海洋红酵母分离鉴定及其代谢产物分析 [J]. *热带作物学报*, 2013, 34(10): 2046-2050.
- [7] 孙建男, 谢为天, 刘颖, 等. 海洋红酵母的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(4): 84-88.
- [8] ZHANG H Y, YANG Q Y, GE L L, et al. Chitin enhances biocontrol of *Rhodotorula mucilaginosa* to postharvest decay of peaches [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 88(7): 465-475.
- [9] YANG K, YANG Y Y, LI Z J, et al. Analysis on nutrition components in *Rhodotorula mucilaginosa* [J]. *Guangdong agricultural sciences*, 2014(5): 146-149, 154.
- [10] 杨世平, 吴灶和, 简纪常. 一株海洋红酵母 (*Rhodospiridium paludigenum*) 的营养组分分析 [J]. *饲料工业*, 2011, 32(10): 52-54.
- [11] 汪洋, 孔维宝, 韩锐, 等. 红酵母简介 [J]. *生物学通报*, 2015, 50(4): 15-17.
- [12] 尹安伟, 路怀灯. 海洋红酵母作为水产饲料添加剂的开发应用研究 [J]. *科学养鱼*, 2010(5): 64-65.
- [13] 孙建男, 刘影, 谢为天, 等. 雷州半岛近岸海域海洋红酵母的分离鉴定 [J]. *热带海洋学报*, 2017, 36(4): 87-92.
- [14] 徐占利, 张红印, 黄星奕. 胶红酵母的急性毒性及遗传毒性研究 [J]. *食品工业科技*, 2010(12): 303-305.

(上接第 72 页)

不利于产甲烷菌的生长,但随着发酵反应的不断进行,氧化乐果被降解,pH 稳步升高,最终会稳定在利于细菌生长的 pH 范围内。

(2) 该研究结果表明,利用城市绿化废弃物厌氧发酵降解农药的方法是可行的,该方法不仅可以处理废物,生产沼气,还可以促进农药的降解。因此,可以在以厌氧消化为主要工艺的沼气工程设置试点,进一步研究农药降解的最大负荷,观察实际效果,并推广该方法。

参考文献

- [1] ALI G, NITIVATTANANON V, ABBAS S, et al. Green waste to biogas: Renewable energy possibilities for Thailand's green markets [J]. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2012, 16(7): 5423-5429.
- [2] 涂亿江. 我国农药残留快速检测技术的研究与应用现状 [J]. *农药科学与管理*, 2003, 24(4): 14-16.
- [3] 朱赫, 纪明山. 农药残留快速检测技术的最新进展 [J]. *中国农学通报*,

- 2014, 30(4): 242-250.
- [4] 陈荣艳. 新能源沼气在农村发展中的利用 [J]. *农业与技术*, 2013(9): 7.
- [5] 成官文, 朱宗强, 胡乐宁, 等. 几种常见农业有机废物产沼气研究 [C] // 第十届中国科协年会论文集(二). 北京: 中国科学技术协会学会学术部, 2008.
- [6] 孙树贵, 任广鑫, 翟宁宁, 等. 中温下 3 种落叶厌氧发酵产气量研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(19): 10164-10166.
- [7] 刘荣厚, 郝元元, 武丽娟. 温度条件对猪粪厌氧发酵沼气产气特性的影响 [J]. *可再生能源*, 2006(5): 32-35.
- [8] 高玲, 杨元, 景露, 等. 水中 13 种有机磷农药的固相萃取-气相色谱-质谱测定法 [J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(8): 723-725.
- [9] 刘丰茂, 钱传范, 江树人. 水中 12 种农药的固相萃取及 GC-MS 测定方法研究 [J]. *农药学报*, 2000, 2(2): 89-93.
- [10] 钟宁, 曾清如, 姜洁凌, 等. 有机磷农药的降解及其研究进展 [J]. *现代农药*, 2005, 4(6): 1-6.
- [11] 陈少华, 罗建军, 林庆胜, 等. 农药残留降解方法研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(1): 343-345.
- [12] 吉喜燕. 有机磷农药在厌氧消化系统中的降解研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2016.