

# 一种微生物絮凝剂急性毒性和诱变毒性作用的研究

刘 敏, 李 姿, 秦光和, 杨希良, 胡嘉想\*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

**摘 要:** **目的** 研究一种微生物絮凝剂受试物的急性毒性和诱变毒性作用。**方法** 分别对微生物絮凝剂进行了小鼠急性经口毒性试验、Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验。**结果** 该微生物絮凝剂的小鼠急性经口毒性试验  $LD_{50} \geq 5000$  mg/(kg BW); Ames 试验中, 各剂量组回复突变菌落数均未见明显增加, 亦无剂量-反应关系; 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验中, 微生物絮凝剂各剂量组微核细胞率与阴性对照组比较差异无显著性。**结论** 该微生物絮凝剂对昆明种小鼠的急性经口毒性属实际无毒, 在 Ames 试验中未呈现致突变作用, 未见诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的能力。

**关键词:** 微生物絮凝剂; 急性毒性; Ames 试验; 微核; 诱变

## Acute toxicity and mutagenicity of a microbial flocculant

LIU Min, LI Zi, QIN Guang-He, YANG Xi-Liang, HU Jia-Xiang\*

(Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the acute toxicity and potential mutagenicity of a microbial flocculant. **Methods** The mouse acute oral toxicity test, Ames test and bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus test were carried out on microbial flocculants. **Results** In mouse acute oral toxicity test,  $LD_{50}$  was higher than 5000 mg/(kg BW). Compared to the negative control group, the treatment group showed an absence of mutagenicity in the Ames test, and no dose-response relationship. No significant difference among testing groups and negative control group was found in mouse bone marrow poly chromatic erythrocyte micronucleus test. **Conclusion** The microbial flocculant shows non-toxic effects in mouse acute test, has no sign to indicate a reverse mutation in Ames test, and has no potential capacity to induce micronucleus formation in mouse bone marrow polychromatic erythrocyte.

**KEY WORDS:** microbial flocculant; acute toxicity; Ames test; micronucleus; mutagenicity

## 1 引 言

近年来, 絮凝剂作为一种水处理剂被广泛应用到食品工业、发酵工业、城市废水处理中<sup>[1-3]</sup>。絮凝剂一般可分为有机合成高分子絮凝剂、无机絮凝剂和微生物絮凝剂。有机合成的高分子絮凝剂因其良好的絮凝效果和低廉的价格被广泛应用。但此类絮凝剂, 如聚丙烯酰胺的单体, 疑似有神经毒性和三致效应(致畸、致癌、致突变)<sup>[4]</sup>。使用较多的是聚合硫酸铝、聚合氯化铝等几种无机高分子絮凝剂,

但是也有一定的毒性, 还有可能造成二次污染<sup>[4-6]</sup>。微生物絮凝剂是利用生物技术, 从微生物发酵物中得到产物, 具有高效、安全、无二次污染的特点, 近几年得到了广泛的研究和开发<sup>[7-12]</sup>。由于其经济性和安全性, 生物絮凝剂有可能在未来取代或部分取代传统的无机高分子和合成有机高分子絮凝剂。有文献选用了动物经口毒性试验评价微生物絮凝剂的安全性<sup>[4,8]</sup>, 但对其遗传毒性作用的研究鲜有报道。为了进一步研究微生物絮凝剂的使用安全性, 本研究参照相关文献资料<sup>[13]</sup>, 对微生物絮凝剂进行了动物的急性

\*通讯作者: 胡嘉想, 主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。E-mail: jiaxianghuyncdc@sohu.com

\*Corresponding author: HU Jia-Xiang, Chief Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China. E-mail: jiaxianghuyncdc@sohu.com

毒性试验、Ames 试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验,以期了解其急性毒性和遗传毒性作用,为微生物絮凝剂的进一步研究和开发应用提供一定的科学依据。

2 材料与方法

2.1 材 料

微生物絮凝剂由昆明某公司提供。样品为乳白色液体。实验时,以纯水为溶剂配制成各剂量受试物。

2.2 试验动物

昆明种小鼠,SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号: SCXK-(湘)2011-0003。

2.3 实验方法<sup>[14]</sup>

2.3.1 急性毒性试验

实验采用一次限量法。剂量为 5000 mg/(kg BW)一个剂量组。20 只健康小鼠,雌雄各半,体重 18.0~22.0 g。灌胃前动物禁食 16 h。以 0.2 mL/10 g BW 2 次经口灌胃,连续观察 14 d,记录动物中毒症状及死亡情况。

2.3.2 Ames 试验

实验菌株为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100 和 TA102。大鼠肝 S9 混合液作为代谢活化系统。试验分别设 4 个剂量组,各剂量组微生物絮凝剂浓度分别为每皿 5000、1000、200、40 μg,同时设溶剂对照(灭菌纯水)、阳性对照(敌克松、叠氮钠、2-氨基苄、1,4-二羟基蒽醌)及空白对照组。采用平板掺入法,每个菌株每个测试剂量均做 3 个平行皿,37 ℃下培养 48 h 后计数每皿回复菌落数。

2.3.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

选取体重为 25~30 g 健康昆明种小鼠 50 只,按体重随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。试验设 5000、2500、1250 mg/(kg BW) 3 个剂量组、阴性对照组(纯水)及阳性对照组(环磷酰胺 40 mg/(kg BW))。阴性对照组和 3 个微生物絮凝剂剂量组经口灌胃给予受试物,阳性对照组采用腹腔

注射。第 2 次给予受试物 6 h 后,处死小鼠,取股骨进行骨髓常规制片。Giemsa 染色后。每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)及 PCE 微核发生率。同时计数每 200 个 PCE 所观察到的成熟红细胞(red blood cell, RBC)数。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件处理数据,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  时,差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 急性经口毒性试验

受试动物在观察期间,未见异常表现,未出现死亡。所有动物大体解剖未见病理改变。在本研究中,微生物絮凝剂对昆明种雌、雄性小鼠急性经口毒性  $LD_{50} > 5000$  mg/(kg BW),属实际无毒级物质。

3.2 Ames 试验

如表 1 所示,空白对照组各菌株自发回复突变数均在正常范围内;试验结果显示,在加与不加 S9 时,受试样品各剂量组回复突变菌落数均未见明显增加,无剂量-反应关系。结果表明,在本次试验条件下,微生物絮凝剂没有诱导 TA97、TA98、TA100 和 TA102 回复突变的能力。

3.3 骨髓细胞微核试验

如表 2 所示,微生物絮凝剂各剂量组 PCE/RBC 均在正常值范围内,未明显少于阴性对照组,说明实验染毒剂量合适。阳性对照组微核率与溶剂对照组及各剂量组比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),微核率均在正常值范围内。微生物絮凝剂 3 个剂量组微核率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果表明,在本次实验条件下,微生物絮凝剂未使小鼠骨髓 PCE 微核率发生明显改变。

表 1 微生物絮凝剂 Ames 试验结果( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 The results of Ames experiment ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | TA97    |         | TA98     |          | TA100    |          | TA102    |        |
|-----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|
|           | -S9     | +S9     | -S9      | +S9      | -S9      | +S9      | -S9      | +S9    |
| 5000 μg/皿 | 130±23  | 134±14  | 36±3     | 44±5     | 170±32   | 180±8    | 290±6    | 291±14 |
| 1000 μg/皿 | 129±21  | 136±10  | 39±5     | 40±2     | 146±7    | 148±19   | 296±15   | 261±14 |
| 200 μg/皿  | 144±18  | 151±23  | 38±4     | 41±5     | 141±13   | 167±15   | 267±28   | 287±14 |
| 40 μg/皿   | 115±19  | 147±27  | 39±4     | 41±2     | 159±23   | 154±23   | 266±31   | 292±22 |
| 空白对照      | 143±13  | 150±13  | 39±2     | 42±4     | 138±12   | 137±16   | 291±23   | 287±17 |
| 溶剂对照      | 128±23  | 139±16  | 38±3     | 40±4     | 145±7    | 170±25   | 266±26   | 292±8  |
| 阳性对照      | 2621±98 | 1717±69 | 1192±100 | 5957±333 | 3035±117 | 3011±110 | 1013±153 | 976±97 |

注: 阳性对照: TA97、TA98、TA102-S9 用敌克松 50 μg/皿; TA100-S9 用叠氮钠 1.5 μg/皿; TA97、TA98、TA100+S9 用 2-氨基苄 10 μg/皿; TA102+S9 用 1,4-二羟基蒽醌 50 μg/皿。

表 2 微生物絮凝剂小鼠骨髓细胞微核试验结果  
Table 2 The results of mouse bone marrow micronucleus test of microbial flocculant

| 性别 | 组别              | 观察 PCE 数 | 微核数 | 微核率(‰) | PCE/RBC |
|----|-----------------|----------|-----|--------|---------|
| 雌  | 阴性对照            | 5000     | 8   | 1.6    | 0.92    |
|    | 1250 mg/(kg BW) | 5000     | 8   | 1.6    | 0.88    |
|    | 2500 mg/(kg BW) | 5000     | 7   | 1.4    | 0.88    |
|    | 5000 mg/(kg BW) | 5000     | 7   | 1.4    | 0.90    |
|    | 阳性对照            | 5000     | 110 | 22.0** | 0.85    |
| 雄  | 阴性对照            | 5000     | 8   | 1.6    | 0.96    |
|    | 1250 mg/(kg BW) | 5000     | 9   | 1.8    | 0.89    |
|    | 2500 mg/(kg BW) | 5000     | 5   | 1.0    | 0.88    |
|    | 5000 mg/(kg BW) | 5000     | 5   | 1.0    | 0.87    |
|    | 阳性对照            | 5000     | 109 | 21.8** | 0.86    |

注: \*\*表示与阴性对照组比较,  $P < 0.01$ 。

4 结论与讨论

本研究选用急性经口毒性试验、Ames 试验和骨髓细胞微核试验, 从急性毒性、细菌回复突变和体细胞微核形成 3 个不同角度对微生物絮凝剂进行了急性和致突变性的评价。急性经口毒性试验是检测和评价受试物毒性作用最基本的一项试验, 在短期内观察动物所产生的毒性反应。Ames 试验用于检测有害物质的体外致突变性, 主要检测的遗传学终点为基因内的点突变和移码突变, 具有快速、有效、经济的特点。骨髓细胞微核试验是一种用于检测体内染色体损伤突变和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的试验方法<sup>[15]</sup>。本研究中, 该微生物絮凝剂属实际无毒级物质, 在 Ames 试验中未呈现致突变性, 也未见诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的能力。在本研究条件和剂量范围内, 未发现本微生物絮凝剂受试物的急性毒性和诱变毒性作用。

参考文献

[1] 湛含辉, 张晓琪, 湛雪辉, 等. 水处理中微生物絮凝剂的研究进展及方法[J]. 湖南工业大学学报, 2002, 16(4): 103-104.  
Zhan HH, Zhang XQ, Zhan XH, *et al.* The advance and method of microbial flocculant research in water treatment [J]. J Zhuzhou Inst Technol, 2002, 16(4): 103-104.

[2] 董双石, 王爱杰, 任南琪, 等. 微生物絮凝剂处理废水的研究和发展趋势[J]. 生物技术, 2004, 14(1): 72-74.  
Dong SS, Wang AJ, Ren NQ, *et al.* Research and development trend of microbial flocculant for wastewater treatment [J]. Biotechnology, 2004, 14(1): 72-74.

[3] 刘玉波, 明玉杰, 王建华, 等. 微生物絮凝剂应用进展与发展前景[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(10): 617-619.  
Liu YB, Ming YJ, Wang JH, *et al.* Microbial flocculant application

progress and prospects for development [J]. Qilu Pharm Aff, 2008, 27(10): 617-619.

[4] 魏飞, 金中华, 孙军德, 等. 微生物絮凝剂及其在污水处理中的应用[J]. 微生物学杂志, 2004, 25(1): 78-81.  
Wei F, Jin ZH, Sun JD, *et al.* Microbial flocculant and its application in waste water treatment [J]. J Microbiol, 2004, 25(1): 78-81.

[5] 陶然, 杨朝晖, 曾光明, 等. 微生物絮凝剂及其絮凝微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 82-87.  
Tao R, Yang CH, Zeng GM, *et al.* Advance in microbial flocculant and flocculant microbe [J]. J Microbiol, 2005, 25(4): 82-87.

[6] 张娜, 尹华, 秦华明, 等. 微生物絮凝剂的稳定性及其对城市污水厂浓缩污泥的絮凝脱水[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 685-689.  
Zhang N, Yin H, Qin HM, *et al.* Study on stability of microbial flocculant and its application to municipal thickened sludge dewatering [J]. Microbiology, 2008, 35(5): 685-689.

[7] 王香爱. 我国微生物法水处理技术的研究进展[J]. 化工科技, 2009, 17(2): 50-54.  
Wang XA. Studies on microbial flocculation for the water treatment in our country [J]. Sci Technol Chem Ind, 2009, 17(2): 50-54.

[8] 邱军强, 乐韵, 郑文炳. 微生物絮凝剂在养殖废水处理中的应用[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 98-101.  
Qiu JQ, Le Y, Zheng WB. The application of microbial flocculant in aquaculture waste water treatment [J]. J Biol, 2011, 28(6): 98-101.

[9] 杨思敏, 尹华, 叶锦韶, 等. 黑曲霉分泌微生物絮凝剂的效果及其絮凝特性[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2014, 35(1): 26-31.  
Yang SM, Yin H, Yue JS, *et al.* Effect of microbial flocculant produced by *Aspergillus niger* and its flocculation characteristics [J]. J Jinan Univ: Nat Sci Med Ed, 2014, 35(1): 26-31.

[10] 王德馨, 史新元, 郭吉野, 等. 中药废渣发酵生产微生物絮凝剂研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, (3): 515-519.  
Wang DX, Shi XY, Wu JY, *et al.* Study on microbial flocculant produced by waste residue of Chinese medicine [J]. World Sci Technol-Mod Chin Med, 2013(3): 515-519.

[11] 周云, 刘英, 张志强, 等. 微生物絮凝剂制备的研究新进展[J]. 环境污

染与防治, 2014, 36(4): 80–85.

Zhou Y, Liu Y, Zhang ZQ, *et al.* Recent research progress on the preparation of microbial flocculants [J]. Environ Pollut Control, 2014, 36(4): 80–85.

[12] 郝建安, 杨波, 姜天翔, 等. 常压室温等离子体诱变选育微生物絮凝剂高产菌株[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(6): 805–808.

Hao JA, Yang B, Jiang TX, *et al.* Screening of microbial flocculant high-producing strains by atmospheric and room temperature plasma [J]. Lett Biotechnol, 2015, 26(6): 805–808.

[13] 张爱华, 孙志伟. 毒理学基础[M]. 北京: 科学出版社, 2008.  
Zhang AH, Sun ZW. Toxicology foundation [M]. Beijing: Science Press, 2008.

[14] 生活饮用水卫生规范[S].  
Hygienic standard for drinking water [S].

[15] 李寿祺. 毒理学原理与方法[M]. 第 2 版. 成都: 四川大学出版社, 2003.

Li SQ. Principles and methods of toxicology (2nd Ed) [M]. Chengdu:

Sichuan University Press, 2003.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘 敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。  
E-mail: min6280@sohu.com

胡嘉想, 硕士研究生, 主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。  
E-mail: jiaxianghuyncdc@sohu.com