

臭氧减菌化处理罗非鱼片的急性毒性与遗传毒性

赵永强¹, 杨贤庆¹, 李来好^{1*}, 钟志勇², 郝淑贤¹,
武昕², 魏涯¹, 岑剑伟¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300;
2. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248)

摘要:为评价经臭氧处理后罗非鱼片产品的安全性,本研究分别采用 SD 大鼠急性经口毒性实验与 KM 小鼠遗传毒性实验来研究经臭氧处理后罗非鱼片的急性毒性与遗传毒性。结果显示:臭氧处理后的罗非鱼片对 SD 大鼠经口最大耐受剂量 MTD > 15 g/kg; 无论有无 S9 代谢活化系统,罗非鱼片 5 个剂量组 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株的回变菌落数最大值为(156 ± 10)个/皿,均未超过阳性对照组 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株回变菌落数最小值[(1 773 ± 83)个/皿]的 2 倍,重复实验结果一致;罗非鱼片高、中、低剂量小鼠的骨髓微核率分别为(0.40% ± 0.88%)(♀)/(0.40% ± 0.83%)(♂)、(0.60% ± 0.89%)(♀)/(0.80% ± 1.29%)(♂)与(0.80% ± 1.09%)(♀)/(0.60% ± 0.89%)(♂),与溶剂对照组微核率(1.20% ± 1.29%)(♀)/(0.40% ± 0.89%)(♂)相比无显著性差异($P > 0.05$);罗非鱼片高、中、低剂量组小鼠睾丸染色体总畸变率分别为 0.2%、0.2% 和 0.1%,与溶剂对照组总畸变率 0.2% 相比无显著性差异($P > 0.05$)。研究表明:Ames 实验、KM 小鼠骨髓微核实验及睾丸染色体畸变实验结果均为阴性,经 4.5 g/mL 臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片毒性分级为无毒且无遗传毒性。

关键词:罗非鱼片;臭氧减菌化;急性毒性;遗传毒性

中图分类号:TS 201.6; S 983

文献标志码:A

据统计^[1],2011 年全国罗非鱼养殖量为 144.1 万 t,加工量为 59.5 万 t,较 2010 年增加 0.15%,出口量已超过 20 万 t,达到历史最高水平。罗非鱼主要加工及出口产品为冷冻鱼片,主要出口国为美国和墨西哥。

为避免鱼片加工过程中传统抑菌剂的残留,臭氧减菌化保鲜技术越来越为罗非鱼加工企业所青睐^[2]。臭氧作为一种高效广谱类的抗菌剂,其抑菌作用机理是氧化破坏微生物细胞中的重要组成部分,如细胞壁、细胞膜、线粒体与细胞核等^[3]。臭氧处理可以显著降低食品中腐败菌的数量,从而达到产品保鲜的目的。臭氧在食品工业中的应用历史比较长,且在应用过程中存在诸

多争议,2001 年,美国 FDA 已正式批准臭氧可作为二级食品直接接触添加剂,并能作为微生物抑制剂使用^[4],某些企业在出口美国的罗非鱼片产品的生产过程中使用臭氧进行减菌化处理,目前我国国家标准^[5]的食品添加剂列表中没有列出臭氧,因此其在国内水产品加工中的应用尚存争议。研究表明,臭氧的遗传毒性主要表现在对 DNA 与 RNA 的损伤^[6-9]、致突变性^[10]、染色体畸变、致癌性^[11]及生殖致畸性^[12]等;此外水与臭氧接触后产生的消毒副产物(disinfection by-products, DBPs)具有遗传毒性、生殖毒性及潜在的致癌性^[13]。迄今为止,尚未见有关臭氧减菌化处理罗非鱼片产品安全性的评价研究。因此本

收稿日期:2014-01-17 修回日期:2014-05-18

资助项目:国家自然科学基金(31271957);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2014TS06);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49);“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD28B00)

通信作者:李来好, E-mail: laihaoli@163.com

研究以急性毒性实验 (acute toxicity test) 的方法确定臭氧处理后尼罗罗非鱼 (*Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*) 片对 SD 大鼠经口最大耐受剂量及毒性分级;同时以遗传毒性实验 (genetic toxicity test) 的方法评价臭氧减菌化处理罗非鱼片对生殖细胞及体细胞的致突变性,初步评价遗传危害性,预测致癌可能性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

受试样品 鲜活罗非鱼 (500 ± 100) g, 购于本地超市。罗非鱼清水洗净,经击昏、放血、去鳞、剖片、冲洗、沥水后用 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min,并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

实验动物 SD 大鼠与昆明小鼠 (Kunming mice, KM 小鼠) 均由广东省医学实验动物中心提供,饲养在 SPF 级动物房,检疫合格。SD 大鼠,SPF 级:40 只,雌雄各半,实验开始时体质量:雄:193.2 ~ 223.1 g,雌:190.2 ~ 206.9 g;KM 小鼠,SPF 级:50 只,雌雄各半,实验开始时体质量:19.8 ~ 25.0 g;雄性 50 只 (小鼠睾丸染色体畸变实验用),实验开始时体质量:24.2 ~ 30.6 g。

试剂与仪器 对二甲氨基苯重氮磺酸钠盐 (fenaminosulf, Dexon) 购于德国 Dr. Enrenstorfer GmbH 公司;叠氮化钠 (sodium azide, SA) 购于上海 Mbchem 公司;2-氨基蒽 (2-aminoanthracene, 2-AF) 购于美国 Alfa Aesar 公司;注射用环磷酰胺购于江西恒瑞医药股份有限公司;生理盐水购于广州科伦药业有限公司;营养肉汤培养基、琼脂培养基购于广东环凯微生物科技有限公司;D-生物素购于 MDBIO. INC 公司;辅酶-II 购于 Roche 公司;葡萄糖-6-磷酸钠盐购于 MDBIO. INC 公司;Giemsa 染色液购于南京凯基生物科技发展有限公司;小牛血清购于 GBICO 公司;秋水仙素购于 MBCHEM 公司;其他常规试剂均为分析纯,购于广州化学试剂厂。

PHX 型生化培养箱,宁波莱福科技有限公司;BSC-1300 II A2 型生物安全柜,苏州安泰空气技术有限公司;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州净化有限公司;LMQ. C 型全自动灭菌器,山东新华医疗器械有限公司;JJ1006 型电子天平,中国双杰集团有限公司;MS3 型迷你振荡器,德国 IKA 公司;DK-8AD 型恒温水浴锅,上海一恒科技有限

公司;CX21 型生物显微镜,日本奥林巴斯公司;BS-3000A 型电子天平,上海友声衡器有限公司。

1.2 实验方法

臭氧减菌化处理罗非鱼片对 SD 大鼠急性经口毒性实验 称取罗非鱼片样品 75 g,常压沸水煮熟 3 ~ 5 min,加入少量纯净水研磨,再加纯净水,用量筒定容至 200 mL,得 0.375 g/mL 的罗非鱼肉混悬溶液。将检疫合格的 40 只 SD 大鼠按体质量随机分为罗非鱼片组和溶剂对照组,20 只/组,雌雄各半。采用最大耐受剂量法,给予受试物前大鼠禁食约 12 h,不禁水。罗非鱼片组,采用灌胃方式,将 0.375 g/mL 的罗非鱼肉混悬溶液以最大耐受剂量 (2 mL/100 g 体质量) 喂予实验大鼠,每天 2 次,上、下午各 1 次。给予受试物后禁食约 2 h 后正常喂食。溶剂对照组用相同的方法给予纯净水。

在给予受试物第 0 天、第 1 天、第 3 天、第 7 天及第 14 天各称量动物体质量 1 次。观察动物体质量变化、饮食、外观、行为、分泌物、排泄物以及动物死亡情况等。观察并记录给予受试物过程及观察期内大鼠每天的表现、死亡情况,对死亡大鼠及时进行解剖并观察,必要时取病变脏器进行组织病理学检查,连续观察 14 d,结果判定采用最大耐受剂量法。

鼠伤寒沙门氏菌回复突变实验 (Ames 实验) 选用 GB 15193.4 - 2003《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》^[14] 推荐的研究方法进行。最高剂量的确定:配制 50、10、2、0.4、0.08 mg/mL 的罗非鱼片稀释液;观察浸泡过罗非鱼片稀释液的滤纸片的抑菌圈,结果发现所有滤纸片周围均无抑菌圈,故罗非鱼片 5 个剂量组剂量分别为:5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}/\text{皿}$,另设蒸馏水溶剂对照组和阳性对照组 (Dexon、SA 和 2-AF)。各组均设立由大鼠肝匀浆制备的哺乳动物体内肝微粒体多功能氧化酶 S9 混合液对照组 (+ S9)。每组在 \pm S9 条件下各做 3 皿。将 0.1 mL 受试物、0.1 mL 菌液、0.5 mL PBS 或 S9 混合液加入试管内,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 20 min。加入 2 mL 顶层培养基,混匀后倒入铺有底层琼脂的平皿。将平皿放入生化培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。另做溶剂对照组和阳性对照组,计数各平皿的回复突变菌落数。上述实验重复 1 次。

小鼠骨髓细胞微核实验 依据 GB 15193.5

-2003《骨髓细胞微核试验》^[15],设计阳性对照组剂量为40 mg/kg 体质量、罗非鱼片高、中、低剂量组剂量分别为10、5、2.5 g/kg 体质量。按体质量分别将50只KM小鼠随机分为5组,分别为溶剂对照组、阳性对照组、罗非鱼片高剂组、罗非鱼片中剂组、罗非鱼片低剂组,每组10只,雌雄各半。罗非鱼片高、中、低剂量组小鼠每天按2 mL/100 g 体质量灌胃给予相应样品液,阳性对照组、溶剂对照组小鼠每天按2 mL/100 g 体质量分别灌胃给予2 mg/mL 环磷酰胺、蒸馏水,每天1次,连续给药观察2 d,2次灌胃给药间隔24 h。第2次给药后6 h处死小鼠,取出胸骨,将骨髓液与小牛血清液混匀后涂片、晾干、固定、染色、阅片并计算微核率(%)。

小鼠睾丸染色体畸变实验 依据GB 15193.8-2003《小鼠睾丸染色体畸变试验》^[16],设计阳性对照组剂量为40 mg/kg 体质量,罗非鱼片高、中、低剂量组剂量分别为10、5与2.5 g/kg 体质量。按体质量分别将50只雄性KM小鼠随机分为5组,分别为溶剂对照组、阳性对照组、罗非鱼片高剂组、罗非鱼片中剂组、罗非鱼片低剂组。每组10只,雌雄各半。溶剂对照组、罗非鱼片高剂组、罗非鱼片中剂组、罗非鱼片低剂组小鼠每天按2 mL/100 g 体质量灌胃,阳性对照组每天按0.1 mL/10 g 体质量腹腔注射4 mg/mL 环磷酰胺,连续给药5 d后,继续正常喂养9 d。各组均于第3次给予受试物后的第14天将受试动物腹腔注射秋水仙素,6 h后处死,制片、阅片,观察

染色体的结构畸变,如裂隙、断片、微小体等。

1.3 数据分析与统计

所有实验数据采用IBM® SPSS® Statistics Version 20与Microsoft® Excel 2013进行分析。单因素方差(One-Way ANOVA)分析,采用LSD与Duncan检验组间的差异,实验组与对照组间差异检验采用配对样本 t 检验, $P < 0.01$ 为非常显著, $P < 0.05$ 为显著, $P > 0.05$ 为不显著,各组计算数据均采用平均值±标准差(mean±SD)表示。急性毒性实验及遗传毒性实验结果依照《保健食品检验与评价技术规范》^[17]进行判定。

2 结果与分析

2.1 SD大鼠急性经口毒性实验结果

急性经口毒性实验是指1次或24 h内多次染毒的实验,主要测定受试物的半数致死量或浓度,并观察实验动物的中毒表现。该实验中,罗非鱼片组、溶剂对照组各20只SD大鼠在给予受试物过程及14 d观察期内,大鼠表现行为、活动状况、呼吸、姿势等均未见异常,无大鼠死亡。动物解剖后,肉眼观察大鼠的心脏、肝脏、脾、胃、肠、肾及生殖腺等脏器外形、颜色、大小与比例,均未见任何异常,大鼠脏器未发生病变。大鼠体质量正常增长,罗非鱼片组大鼠体质量在各测定时间点与溶剂对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)(表1),因此在该实验条件下,经4.5 mg/L浓度的臭氧水处理30 min后的罗非鱼片对SD大鼠经口最大耐受剂量MTD > 15 g/kg,毒性分级为无毒。

表1 SD大鼠急性经口毒性实验体质量结果

Tab.1 Weight results of acute oral toxicity test in SD rats

组别 group	性别 sex	时间/d time				
		0	1	3	7	14
I	♂	205.9 ± 7.8 ^a	224.8 ± 7.0 ^a	244.9 ± 9.5 ^a	270.5 ± 9.9 ^a	304.1 ± 10.7 ^a
	♀	184.7 ± 4.5 ^b	197.6 ± 7.8 ^b	204.9 ± 9.3 ^b	209.5 ± 10.8 ^b	218.7 ± 10.2 ^b
II	♂	207.6 ± 6.9 ^a	223.7 ± 8.1 ^a	243.4 ± 8.3 ^a	271.7 ± 8.5 ^a	307.7 ± 10.7 ^a
	♀	186.9 ± 5.1 ^b	196.9 ± 5.1 ^b	207.5 ± 6.6 ^b	213.4 ± 6.6 ^b	222.0 ± 6.9 ^b

注: I组为罗非鱼片组, II组为对照组;同一列中数字上标不同字母表示数据间有显著性差异($P < 0.05$)

Notes: group I is the Nile tilapia fillets group, group II is the control group; data within the same column with the different letters are significantly different($P < 0.05$)

2.2 KM小鼠遗传毒性实验结果

Ames实验 Ames实验是检测基因突变最常用方法之一,其原理是鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的突变菌株在有组氨酸的培养基上可以正常生长,当培养基中无组氨酸时,除少数自发回变菌落生长外,其余不能正常生

长,且当有能引起该菌基因移码突变或碱基置换的致突变剂存在时,突变型会回复突变为组氨酸非缺陷型野生型,使细菌生长增多。当激活某些致突变剂后会引发沙门氏菌突变型发生回复突变,由S9混合液进行受试物的代谢激活作用并测定致突变物质引起的复归突然变异频度作为检出

突变性,即可检查受试物是否为致突变物质。该实验中选用的组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株为 TA97、TA98、TA100 和 TA102 4 种。

一般观察:各组各皿均未见细菌毒性表现及沉淀;当无 S9 活化系统时,100 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量的诱变剂 Dexon 引起 TA97、TA98 及 TA102 菌株的回变菌落数分别为(1 856 \pm 80)、(1 965 \pm 60)及(1 899 \pm 35)个/皿,5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量的诱变剂 SA 引起 TA100 菌株的回变菌落数为(1 944 \pm 44)个/皿,均显著高于溶剂对照组的 2 倍($P < 0.01$);当有 S9 活化系统时,100 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量的诱变剂 2-AF 引起 TA97、TA98、T100 及 TA102 菌株的回变菌落数分别为

(1 931 \pm 73)、(1 843 \pm 60)、(1 809 \pm 105)及(1 913 \pm 49)个/皿,显著高于溶剂对照组的 2 倍($P < 0.01$)(表 2)。而罗非鱼片 5 个剂量组 TA97、TA98、TA100 和 TA102 的回变菌落数,无论有无 S9 活化系统,均未超过溶剂对照组回变菌落数的 2 倍,且与重复实验结果一致(表 3)。表明受试罗非鱼片 5 个剂量组样品对 TA97、TA98、TA100 和 TA1024 菌株未见明显的抑菌作用,也没有能引起菌株的基因移码突变或碱基置换的突变剂存在,上述 4 种菌株均未发生回复突变。因此在该实验条件下,经 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片 Ames 实验结果为阴性。

表 2 臭氧处理罗非鱼片对细菌回复突变菌落数的影响

Tab. 2 Effects of ozone-treated Nile tilapia fillets on the cfu of bacterial reverse mutation assay $n = 3$

组别 group	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{皿}$) dose	回复突变菌落数(个/皿, mean \pm SD) cfu of bacterial reverse mutation							
		TA97		TA98		TA100		TA102	
		+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉
I	/	124 \pm 2	125 \pm 2	33 \pm 3	35 \pm 2	175 \pm 10	153 \pm 7	252 \pm 11	263 \pm 15
II	100	/	1 856 \pm 80 **	/	1 965 \pm 60 **	/	/	/	1 899 \pm 35 **
III	5	/	/	/	/	/	1 944 \pm 44 **	/	/
IV	100	1 931 \pm 73 **	/	1 843 \pm 60 **	/	1 809 \pm 105 **	/	1 913 \pm 49 **	/
	5 000	119 \pm 6	117 \pm 4	27 \pm 2	26 \pm 3	157 \pm 8	155 \pm 6	154 \pm 14	147 \pm 8
	1 000	114 \pm 8	122 \pm 4	25 \pm 2	29 \pm 1	151 \pm 8	150 \pm 8	155 \pm 8	148 \pm 11
V	200	126 \pm 10	126 \pm 16	23 \pm 1	23 \pm 2	148 \pm 14	151 \pm 13	150 \pm 12	148 \pm 13
	40	135 \pm 8	146 \pm 17	24 \pm 2	24 \pm 2	147 \pm 8	150 \pm 12	150 \pm 12	148 \pm 11
	8	109 \pm 4	112 \pm 7	23 \pm 1	24 \pm 2	144 \pm 8	149 \pm 9	147 \pm 3	152 \pm 14

注: I 组为溶剂对照组, II 组为 Dexon 阳性对照组, III 组为 SA 阳性对照组, IV 组为 2-AF 阳性对照组, V 组为罗非鱼片组;数据上标“ ** ”表示与溶剂对照组比较有极显著差异($P < 0.01$),下同

Notes: group I is solvent control group, group II is positive control group of Dexon, group III is positive control group of SA, group IV is positive control group of 2-AF, and group V is the Nile tilapia fillets group; data with “ ** ” is significantly different with the control group($P < 0.01$), the same as below

表 3 臭氧处理罗非鱼片对细菌回复突变菌落数的影响(重复实验)

Tab. 3 Effects of ozone-treated Nile tilapia fillets on the cfu of bacterial reverse mutation assay (repeated assay)

$n = 3$

组别 group	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{皿}$) dose	回复突变菌落数(个/皿, mean \pm SD) cfu of bacterial reverse mutation							
		TA97		TA98		TA100		TA102	
		+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉
I	/	124 \pm 4	122 \pm 4	33 \pm 2	30 \pm 2	176 \pm 9	156 \pm 12	242 \pm 9	257 \pm 22
II	100	/	1 876 \pm 70 **	/	1 997 \pm 114 **	/	/	/	1 837 \pm 58 **
III	5	/	/	/	/	/	2 012 \pm 25 **	/	/
IV	100	1 938 \pm 29 **	/	1 878 \pm 47 **	/	1 773 \pm 83 **	/	1 873 \pm 83 **	/
	5 000	120 \pm 4	116 \pm 5	24 \pm 2	26 \pm 1	156 \pm 10	155 \pm 3	151 \pm 11	152 \pm 3
	1 000	120 \pm 6	120 \pm 4	27 \pm 1	26 \pm 2	149 \pm 3	152 \pm 6	152 \pm 4	154 \pm 15
V	200	121 \pm 2	137 \pm 13	24 \pm 2	24 \pm 1	159 \pm 9	151 \pm 2	151 \pm 11	150 \pm 11
	40	127 \pm 15	153 \pm 9	23 \pm 1	23 \pm 2	146 \pm 6	150 \pm 15	150 \pm 11	148 \pm 11
	8	116 \pm 3	115 \pm 4	25 \pm 2	24 \pm 1	143 \pm 5	150 \pm 2	145 \pm 5	152 \pm 11

2.3 骨髓微核实验

骨髓微核实验 (micronucleus test) 是以诱发小鼠骨髓红细胞微核为指标来推断受试物染色体或有丝分裂器损伤的一种遗传毒性实验,常用于预测受试物的致癌潜力^[18-19]。根据细胞中纺锤体受损而丢失的染色体或胞内无着丝粒染色体片段在细胞分裂后期仍存留于子细胞细胞质中形成的微核,来判断受试物引起染色体异常作用的一种哺乳动物体内实验^[20]。

阳性对照组雌性动物的微核率显著高于溶剂对照组 ($P < 0.01$),罗非鱼片高、中、低剂量组雌性动物的微核率分别为 0.40‰、0.60‰、0.80‰,与溶剂对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$);阳性对照组雄性动物的微核率显著高于溶剂对照组 ($P < 0.01$),罗非鱼片高、中、低剂量组雄性动物的微核率分别为 0.40‰、0.80‰、0.60‰,与溶剂对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 4)。臭氧处理后罗非鱼片未对 KM 小鼠的骨髓细胞微核率产生具有统计学差异的影响,也无任何剂量反应关系,未影响细胞分裂时染色体的变化,对染色体也无明显断裂效应。在该实验条件下,经 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片骨髓细胞微核实验结果为阴性。

2.4 睾丸染色体畸变实验

染色体畸变是反映生殖细胞 DNA 损伤的敏感指标,实验通过光镜直接观察染色体的数目和

形态的变化(如断裂、易位、缺失及裂隙等),亦可称为细胞遗传学实验 (cytogenetic assay)。小鼠睾丸染色体畸变实验属体内染色体畸变实验^[21]。

表 4 臭氧处理罗非鱼片对 KM 小鼠骨髓细胞微核形成的影响

Tab. 4 Effect of ozone-treated Nile tilapia fillets on micronucleus formation of bone marrow cells of KM mice $n = 5$

组别 group	性别 sex	剂量/ (mg/kg) dose	死亡率/% mortality	微核率/% micronucleus rate
I	♀	—	0	1.20 ± 1.29
	♂	—	0	0.40 ± 0.89
II	♀	40	0	34.70 ± 2.00 **
	♂		0	33.00 ± 3.36 **
III	♀	10 000	0	0.40 ± 0.88
	♂		0	0.40 ± 0.83
IV	♀	5 000	0	0.60 ± 0.89
	♂		0	0.80 ± 1.29
V	♀	2 500	0	0.80 ± 1.09
	♂		0	0.60 ± 0.89

注: I、II、III、IV 与 V 组分别为溶剂对照组、阳性对照组、罗非鱼片高剂量组、罗非鱼片中剂量组及罗非鱼片低剂量组;数据上标“**”表示与溶剂对照组比较有极显著差异 ($P < 0.01$),下同
Notes: group I and II are solvent control and positive control group respectively, group III, IV and V are high-dose, middle-dose and low-dose of Nile tilapia fillets group respectively; data with “**” is significantly different from the control group ($P < 0.01$), the same as below

表 5 臭氧处理罗非鱼片小鼠睾丸染色体畸变实验结果

Tab. 5 Results of chromosomal aberration assay of mice testicle for ozone-treated Nile tilapia fillets

组别 group	I	II	III	IV	V
剂量/(mg/kg) dose	—	40	10 000	5 000	2 500
细胞数 cell number	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
断裂 break	1	26	1	1	0
断片 fragment	0	0	0	0	0
易位 translocation	0	0	0	0	0
缺失 deletion	0	0	0	0	0
环状 ring chromosome	1	68	0	1	1
微小体 minute body	0	5	1	0	0
姐妹单体交换 sister chromatid exchange	0	0	0	0	0
多着丝点染色体 polycentric chromosome	0	4	0	0	0
裂隙 gap	0	0	0	0	0
畸变总数 total number of distortion	2	103	2	2	1
总畸变率/% total aberration rate	0.2	10.3 **	0.2	0.2	0.1

一般来说,由于不同周期的雄性生殖细胞对化学物质具有不同的敏感性,化学诱变剂诱发染

色体畸变必须经过 DNA 复制期,因此本研究在细线期 (leptotene stage) 前进行诱变处理,第 14 天

采样,观察在诱变剂细线期前引起的精母细胞染色体效应^[16]。阅片观察后发现阳性对照组小鼠的睾丸染色体出现断裂、环状、微小体和多着丝点染色体的细胞数分别为 26、68、5 和 4 个,畸变总数为 103 个,总畸变率为 10.3%,与溶剂对照组(0.2%)相比极显著升高($P < 0.01$);罗非鱼片高、中、低剂量睾丸染色体畸变率分别为 0.2%、0.2%、0.1%,与溶剂对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$) (表 5)。有文献报道,通过体外细胞染毒实验发现 O_3 对分裂中期人体口腔表皮癌细胞(human KB cell)染色体断裂率较对照组显著增加^[22];Gooch 等^[23]研究表明,高浓度 O_3 通入含有外源凝集素(phytohaemagglutinin, PHA)刺激的后 S 期人外周血白细胞的 HBSS 液(Hanks' balanced salt solution)90 min 以上,发现当剂量为 14.46 与 15.90 mg/(m³·h)时,细胞有丝分裂时染色单体缺失率显著增加,而在相同的条件下,G1 期细胞染色体则未受明显影响。本研究中,臭氧处理后罗非鱼片残留臭氧浓度较上述研究臭氧暴露值低,在小鼠生殖细胞减数分裂细线期前,以各剂量组罗非鱼片作为诱变剂引起的小鼠睾丸染色体畸变率显著低于阳性对照组。因此,在该实验条件下,经 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片睾丸染色体畸变实验结果为阴性。

3 讨论

急性经口毒性实验是毒性研究的第一步,可初步估计受试物的毒害危险性;Ames 实验是目前被世界各国广为采用的致突变性检测方法,可推测受试物的致癌性;小鼠骨髓细胞微核可反映体细胞接触致突变物和致癌物遗传毒性的敏感指标;如前文所述,小鼠睾丸染色体畸变可反映生殖细胞 DNA 损伤的敏感度。本研究发现,经 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片对 SD 大鼠经口最大耐受剂量 MTD > 15 g/kg,毒性分级为无毒。Ames 实验发现臭氧处理后的罗非鱼片各剂量组未引起 4 种受试菌株发生回复突变,可判定 Ames 实验结果为阴性,这与陈文品等^[24]采用同样的 Ames 实验条件研究普洱茶遗传毒性时的判断原则一致。有学者研究表明微核实验与染色体畸变实验具有良好的相关性^[25],本研究中,经臭氧处理后罗非鱼片骨髓细胞微核实

验与睾丸染色体畸变实验的结果均为阴性,未表现有遗传毒性。

近年来,食品质量安全问题越来越受到政府部门、食品生产企业及消费者的重视,由于水产食品富含蛋白质且具有多种内源酶,较其他食品易腐败变质,因此在开展水产品的减菌化处理方法及贮藏条件研究的同时应重视其产品安全性,尤其是抑菌剂的残留及相关反应产物可能引起的产品质量安全问题。经调研,目前罗非鱼片生产企业减菌化处理使用的臭氧浓度远低于 4.5 mg/L,因此,从急性毒性与遗传毒性的角度来看,经臭氧减菌化处理后的罗非鱼片具有较高的食用安全性。此外,有关臭氧处理后罗非鱼片的安全性还需做更为深入的研究,以进行系统而全面的评价。

参考文献:

- [1] Ministry of agriculture, fisheries bureau. China fishery statistical yearbook 2012 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 2012. 北京: 中国农业出版社, 2012.]
- [2] Zhao Y Q, Li L H, Yang X Q, *et al.* Applications of ozone in aquatic products processing: a review [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9 (5): 149 - 154. [赵永强, 李来好, 杨贤庆, 等. 臭氧在水产品加工中应用综述. 南方水产科学, 2013, 9 (5): 149 - 154.]
- [3] Khadre M A, Yousef A E, Kim J G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review [J]. Journal of Food Science, 2001, 66 (9): 1242 - 1252.
- [4] U. S. F. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice, final rule: Federal Register [Z]. U. S. FDA: 2001, 2001: 66, 6137 - 6202.
- [5] GB 2760 - 2011. National food safety standards-standards for uses of food additives [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2011. [GB 2760 - 2011. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准. 北京: 中国标准出版社, 2011.]
- [6] Xing H Y, Hu X M, Liu H L, *et al.* Study on DNA oxidative damage of O_3 aging model in mice [J]. Journal of West China University of Medical Sciences, 2001, 32 (2): 229 - 231. [幸浩洋, 胡新珉, 刘鸿莲, 等. O_3 衰老小鼠模型的 DNA 损伤研究. 华西医科大学学报, 2001, 32 (2): 229 - 231.]
- [7] Shin G A, Sobsey M D. Reduction of Norwalk virus,

- poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7):3975-3978.
- [8] Roy D, Wong P K, Engelbrecht R S, *et al.* Mechanism of enteroviral inactivation by ozone[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(3):718-723.
- [9] Gong X M, Sun J, Liu P, *et al.* Damage of ozone-produced oxidant to *Vibrio* DNA [J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(10):1-3. [宫小明, 孙军, 刘萍, 等. 臭氧化海水对于弧菌 DNA 的损伤作用. *海洋科学*, 2006, 30(10):1-3.]
- [10] Gartiser S, Hafner C, Kronenberger-Schäfer K, *et al.* Approach for detecting mutagenicity of biodegraded and ozonated pharmaceuticals, metabolites and transformation products from a drinking water perspective[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19(8):3597-3609.
- [11] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, *et al.* Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013, 10(9):3886-3907.
- [12] Johnson N F, Hotchkiss JA, Harkema J R, *et al.* Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1990, 103(1):143-155.
- [13] Lu W Q, Liu A L. A review and prospect about disinfection by-products in drinking water [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2007, 19(3):181-184. [鲁文清, 刘爱林. 饮用水消毒副产物研究进展. *癌变·畸变·突变*, 2007, 19(3):181-184.]
- [14] GB 15193.4-2003. *Salmonella typhimurium/mammals microsomal enzyme test (Ames test)* [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2003. [GB 15193.4-2003. 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验. 北京: 中国标准出版社, 2003.]
- [15] GB 15193.5-2003. Bone marrow cell micronucleus test [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2003. [GB 15193.5-2003. 骨髓细胞微核试验. 北京: 中国标准出版社, 2003.]
- [16] GB 15193.8-2003. Mice testicle cells chromosome aberration test [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2003. [GB 15193.8-2003. 小鼠睾丸染色体畸变试验. 北京: 中国标准出版社, 2003.]
- [17] Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing & assessment of health food [Z]. 2003. [中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范. 2003.]
- [18] Sato S, Tomita I. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances; current status and problems of an in vivo rodent micronucleus assay [J]. *Journal of Health Science*, 2001, 47(1):1-8.
- [19] Abrevaya X C, Carballo M A, Mudry M D. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2007, 30(4):1139-1143.
- [20] Schmid W. The micronucleus test [J]. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1975, 31(1):9-15.
- [21] Mohr J, Jain B, Sutter A, *et al.* A maximum common subgraph kernel method for predicting the chromosome aberration test [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2010, 50(10):1821-1838.
- [22] Fetner R H. Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures [J]. *Nature*, 1962, 194:793-794.
- [23] Gooch P C, Creasia D A, Brewen J G. The cytogenetic effects of ozone: Inhalation and *in vitro* exposures [J]. *Environmental Research*, 1976, 12:188-195.
- [24] Chen W P, Liu Q J, Bai W X, *et al.* Genetic toxicity evaluation of pu'er tea [J]. *Journal of Tea Science*, 2005, 25(3):208-212. [陈文品, 刘勤晋, 白文祥, 等. 普洱茶遗传毒性安全性评价研究. *茶叶科学*, 2005, 25(3):208-212.]
- [25] Miller B, Albertini S, Locher F, *et al.* Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test; industrial experience [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1997, 392(1-2):45-59, 187-208.

Acute toxicity test and genetic toxicity study of Nile tilapia fillets sterilized by ozone treatment

ZHAO Yongqiang¹, YANG Xianqing¹, LI Laihao^{1*}, ZHONG Zhiyong²,
HAO Shuxian¹, WU Xin², WEI Ya¹, CEN Jianwei¹

(1. Key Lab. of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National R&D Center for Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China;

2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

Abstract: Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the lean fish species, and has been known to be a preferable raw material in seafood processing field. As an oxidant, ozone has been gradually used as an antimicrobial additive for direct contact with foods, but there are no special regulation and labelling rules in some countries and regions to date. It is necessary to evaluate the safety of Nile tilapia fillets treated by ozone-water. In this paper, an acute oral toxicity test in SD rats and genetic toxicity test in KM mice were used to evaluate the acute toxicity and the genetic toxicity of Nile tilapia fillets. The results showed that the maximum tolerated dose in SD rats was more than 15 g/kg, the maximum value for cfu of bacterial reverse mutation of TA97, TA98, TA100 and TA102 strains in the 5 dose groups was 156 ± 10 that is less than 2 times of the minimum value for cfu of bacterial reverse mutation of TA97, TA98, TA100 and TA102 strains in positive control groups ($1\ 773 \pm 83$), with or without S9 metabolic activation system, as well as the repeated assay. Therefore, the result of Ames assay was negative. The micronucleus rates of high, middle and low dose groups were $(0.40\% \pm 0.88\%)$ (♀) / $(0.40\% \pm 0.83\%)$ (♂), $(0.60\% \pm 0.89\%)$ (♀) / $(0.80\% \pm 1.29\%)$ (♂) and $(0.80\% \pm 1.09\%)$ (♀) / $(0.60\% \pm 0.89\%)$ (♂) respectively. Moreover, the micronucleus rates of control group are $(1.20\% \pm 1.29\%)$ (♀) / $(0.40\% \pm 0.89\%)$ (♂). The results of bone marrow micronucleus test showed that there was no significant difference between the three dose groups and control group ($P > 0.05$). The results of chromosome aberration test showed that chromosome aberration rates of mouse tests were 0.2%, 0.2% and 0.1% respectively, and there was no significant difference between the three dose groups and control group ($P > 0.05$). The results of chromosome aberration test were negative. The research results showed that all of the Ames assay, bone marrow micronucleus test and chromosome aberration test were negative, there was no genetic toxicity of the tilapia fillets treated 30 min by 4.5 g/mL ozone-water which belonged to non-toxic class.

Key words: tilapia fillets; sterilized by ozone treatment; acute toxicity; genetic toxicity

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com