

文章编号:1003-8701(2015)05-0102-02

枯草芽孢杆菌 JAASB4 的安全性评价

王景会,李 达,姜媛媛,刘香英,迟燕平,李启云*

(吉林省农业科学院,长春 130033)

摘 要:安全是对益生菌最基本的要求。新挖掘的益生菌菌株在商业化生产利用前,必须对菌株的安全性做出充分的评价。本文对新分离鉴定的枯草芽孢杆菌 JAASB4 菌株进行了经口急性毒性和菌株易位两项安全性评价,实验结果表明,菌株对各组实验小鼠的体重、行为、活动、饮食、粪便等体征各项指标均未产生明显异常影响,实验组与对照组的肝脏、脾脏的脏体比也无显著性差异,并且没有发生菌株易位现象,初步证明了枯草芽孢杆菌 JAASB4 的安全性。

关键词:枯草芽孢杆菌;安全性评价;经口急性毒性;菌株易位

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

Evaluation of Safety of *Bacillus subtilis* JAASB4

WANG Jing-hui, LI Da, JIANG Yuan-yuan,

LIU Xiang-ying, CHI Yan-ping, LI Qi-yun*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Safety is the most basic requirements for probiotics. The safety of newly selected probiotic strains must be totally evaluated before its commercial production. In this paper, *Bacillus subtilis* JAASB4, a newly separated and identified strain, was assessed via the oral acute toxicity and translocation. The results showed that there was no obvious abnormal impact on indicators of mice, such as weight, behavior, activity, diet, stool and other signs of dirty body. There were no significant difference in liver, spleen ratio between the experimental group and control group. There is no strain translocation also. Therefore, initial proof showed that *Bacillus subtilis* JAASB4 was safe.

Key words: *Bacillus subtilis*; Evaluation of safety; Acute toxicity via oral; Strain translocation

芽孢杆菌是人类发现最早的细菌之一,早在 1835 年 Ehrenberg 就曾对其进行过描述,1872 年 Cohn 正式将此类细菌命名为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[1]。1997 年 Kunst F 等人已经完成了此类细菌模式菌的完整基因组序列测定。如今,已被广泛应用于农业、工业、食品、医药、卫生、水产、畜牧业及科研等诸多领域^[2-6]。枯草芽孢杆菌虽然是美国 FDA 及我国卫生部都认定的安全菌种。但是,作为新分离鉴定的菌株生理小种资源,对其进行安全性评价依然是非常必要的^[7]。本文从经口急性毒性和菌株易位两个方面对枯草芽孢杆菌 JAASB4 进行安全性的初步评价。

1 材料与方 法

1.1 受试菌株

枯草芽孢杆菌 JAASB4,由吉林省农业科学院食品生物技术实验室分离鉴定。取活化的受试菌株接种到 LB 液体培养基中,37℃培养 20 h 取出,4℃,5000 g 无菌离心 10 min 弃上清,将菌泥制作成冻干粉,有效活菌数为 4.3×10^{11} CFU/g。

1.2 实验动物

健康昆明种小鼠,体重 19 ~ 22 g,由吉林大学实验动物中心提供,动物质量合格证号:SCXK-(吉)2008-0005。

1.3 仪器设备

MLS-3780 高压蒸汽灭菌器,日本 Sanyo 公司;HZQ-X100 全温振荡培养箱,上海一恒科技有限公司;Evolution RC 高速冷冻离心机,美国 Thermo Stovall 公司;JJ200 电子天平,美国双杰公司。BCN-1360B 超净工作台,哈尔滨市东联电子技术

收稿日期:2015-04-24

基金项目:吉林省博士后基金项目(RB201305);吉林省农业科技创新工程项目(ZYCX201315)

作者简介:王景会(1976-),女,研究员,博士,硕士生导师,主要从事农产品加工研究。

通讯作者:李启云,男,博士,研究员,E-mail: qyli1225@126.com

开发有限公司。

1.4 经口急性毒性实验

依据农业部颁发《新兽药一般毒性试验技术要求》和 GB15193.3-2003 进行。采用最大限度法评价枯草芽孢杆菌 JAASB4 对小鼠的经口急性毒性。小鼠 20 只,雌雄各半,预饲 5 d 后进行实验,小鼠实验前禁食 6 h。菌体冻干粉设 5.00 g/kg、8.66 g/kg、15.00 g/kg 3 个组进行预实验,根据预实验的结果,小鼠以 15.00 g/kg 体重剂量给药,给药方式采用 4 h 两次经口灌服,小鼠连续 2 周。观察并记录动物死亡情况及临床表现,计算 LD₅₀。实验期满眼球取血后,立即处死并解剖取出肝脏、脾脏称重,计算肝体比及脾体比。

1.5 菌株易位实验

将 30 只昆明小鼠随机分为 3 组,对照组灌胃生理盐水、低剂量组(5.00 g/kg 体重)及高剂量组(15.00 g/kg 体重)灌胃菌悬液,连续灌胃 4 周,实验期满眼球取血后,立即处死并解剖取出肝脏、脾脏称重,以便计算肝体比及脾体比。然后,分别加入适量的无菌生理盐水匀浆,取组织匀浆液及血液分别涂布于 LB 固体培养基平板,37℃ 培养 48 h,观察菌落生成情况。

1.6 统计分析

采用 SPSS16.0 软件包对实验数据进行数据统计、分析、处理及显著性检验。

2 结果与分析

2.1 急性毒性实验

经口急性毒性是评价外源物质安全性的重要指标,也是受试物毒理学安全性评价的第一步,具有了解受试物急性毒性强弱的作用^[8]。LD₅₀ 是评价受试物急性毒性强弱以及比较其急性毒性大小的一个常用指标,数值越小,则表明受试物急性毒性越强、越大,反之,急性毒性越弱、越小。

小鼠在实验期内未观察到任何中毒症状和明显异常反应,饮水、采食、粪便及行为均正常,无死亡动物出现。实验组与对照组的体重增长差异

不显著(P>0.05),数据统计结果见表 1。观察期满处死小鼠,尸体剖检未发现脏器或组织有明显异常变化,生长发育情况良好,数据统计结果见表 2。本实验枯草芽孢杆菌 JAASB4 冻干粉对小鼠口服 LD₅₀ 大于 15.00 g/kg 体重,该剂量所用浓度已接近可灌胃的最大配制浓度。按照急性毒性分级枯草芽孢杆菌 JAASB4 属实际无毒类物质。

表 1 菌株 JAASB4 急性毒性实验对小鼠体重的影响

| 组别 | 初始体重(g) | 第 1 周体重(g) | 第 2 周体重(g) |
|-----|------------|------------|------------|
| 对照组 | 20.29±1.29 | 24.99±1.62 | 28.01±1.15 |
| 实验组 | 20.81±1.08 | 25.43±1.91 | 30.06±1.03 |

注: P>0.05,实验组与对照组相比无显著性差异,下同

表 2 菌株 JAASB4 急性毒性实验对小鼠脏体比的影响

| 组别 | 肝体比 | 脾体比 |
|-----|---------------|---------------|
| 对照组 | 0.0482±0.0057 | 0.0049±0.0005 |
| 实验组 | 0.0526±0.0069 | 0.0053±0.0006 |

2.2 易位实验

肠道不仅是最重要的营养物质消化和吸收器官,而且肠粘膜具有重要的局部防御屏障功能,对肠道细菌及其毒素的屏蔽上发挥了重要作用。防止聚居在肠道的细菌侵袭全身器官和组织。细菌易位是指胃肠道内活的寄生菌穿过黏膜,进入正常无菌的组织或器官。正常时各脏器与体重的比值比较恒定,称做脏体比或脏器系数,是毒理实验中常用的指标。简便易行,且较为敏感^[9]。细菌易位发生后,受损脏器重量可以发生改变,故脏体比也随之而改变。脏器系数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等。脏器系数减小,表示脏器萎缩及其他退行性改变。易位实验期内小鼠生长正常,未受到任何的影响,对照组与实验组的体重增长差异不显著(P>0.05),统计数据结果见表 3。对小鼠肝脏、脾脏的影响均无显著性差异(P>0.05),数据统计结果见表 4。用小鼠血液、肝脏、脾脏的组织匀浆液涂布的平板都未见菌落长出,实验结果表明,枯草芽孢杆菌 JAASB4 在小鼠体内未发生易位。

表 3 菌株 JAASB4 易位实验对小鼠体重的影响

| 组别 | 初始体重(g) | 第 1 周体重(g) | 第 2 周体重(g) | 第 3 周体重(g) | 第 4 周体重(g) |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 对照组 | 20.31±1.32 | 23.99±1.25 | 26.11±1.82 | 29.15±1.56 | 32.16±1.74 |
| 低剂量组 | 19.96±1.89 | 23.81±1.38 | 26.24±1.31 | 28.88±1.47 | 31.97±1.68 |
| 高剂量组 | 20.57±1.44 | 24.01±1.12 | 26.92±1.09 | 29.83±1.33 | 33.16±1.05 |

(下转第 112 页)

(2)调查发现,公众对无公害有机蔬菜的消费意愿远远小于对蔬菜食品安全的担忧,一个很重要的原因是有机蔬菜的价格相对较高,公众的物质基础仍不能满足消费需求。推广蔬菜无土栽培是一种新型的城市家庭蔬菜栽培模式,蔬菜品质作为一个动态的综合性状,在降低装置价格的同时,切实有效地提高蔬菜品质才是关键。

(3)调查还发现,21~40岁的女性是家庭无土栽培设施主要的潜在消费人群。开发新型家用装置时应更注重简化栽培、操作技术和保障蔬菜质量,针对不同年龄段人群的消费习惯,降低装置一次性投入的同时,也应注意控制运行成本。

(4)应进一步建立完善的蔬菜质量安全检测标准,发展快速检测方法和设备,保证产品信誉,减少无土栽培蔬菜质量安全的隐匿性,引导公众消费。

参考文献:

- [1] 李永胜,杜建军,谢勇.无土栽培技术对蔬菜品质的影响[J].安徽农学通报,2006,12(8):187-190.
- [2] 刑禹贤.无土栽培原理与技术[M].北京:中国农业出版社,2002:1-5.
- [3] 柴晓芹.无土栽培及其发展趋势[J].甘肃农业科技,1999(1):4-5.
- [4] 连兆煌.无土栽培原理与技术[M].北京:中国农业出版社,1994:1-6.
- [5] 郑光华,刘广树.国内外无土栽培的现状与展望[J].中国蔬菜,1992(S1):4-8.
- [6] 周德翼,何德华,王蓓.对武汉市民无公害蔬菜消费行为的研究[J].统计与决策,2007(3):114-115.
- [7] 杨金深,张贯生,智健飞,等.我国无公害蔬菜的市场价格与消费意愿分析[J].中国农村经济,2004(9):43-48.

(责任编辑:王昱)

(上接第103页)

表4 菌株JAASB4易位实验对小鼠脏体比的影响

| 组别 | 肝体比 | 脾体比 |
|------|---------------|---------------|
| 对照组 | 0.0568±0.0081 | 0.0049±0.0016 |
| 低剂量组 | 0.0559±0.0069 | 0.0054±0.0018 |
| 高剂量组 | 0.0571±0.0011 | 0.0055±0.0013 |

3 结论

益生菌对人体有益的功效已经被大量的科学试验证实,然而在研究益生菌功能性的同时,也不能忽视益生菌可能潜在的危害^[10]。枯草芽孢杆菌JAASB4是本实验室分离鉴定的新菌株,已经证明了其在淀粉酶、凝乳酶分泌^[11-12],纳豆制作^[13]及玉米修饰改性^[14]等方面的显著功效,本文从经口急性毒性和菌株易位两个方面对枯草芽孢杆菌JAASB4进行了安全性评价,初步证明了其安全性。进一步的遗传毒性试验、传统致畸试验、慢性毒性试验(包括致癌试验及亚慢性毒性试验等安全性的评价还有待进行,以便为该菌株的商业生产奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] 吴仲贤.群体遗传学[M].北京:农业出版社,1981.
- [2] Erich J, Thorsten. Lipases for biotechnology[J]. Current Opinion in biotechnology, 2012, 31(1): 354-357.

- [3] Simon M, Cutting. Bacillus probiotics[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 214-220.
- [4] 王利宾,孙利娜.枯草芽孢杆菌作用机制及其在养殖业中的应用研究进展[J].饲料博览,2015(1):35-38.
- [5] 刘刚,杨雪,梅雪然,等.枯草芽孢杆菌Loq18抗菌蛋白的分离纯化及其对灰葡萄孢的抑制活性[J].四川师范大学学报(自然科学版),2015(1):46-49.
- [6] 冀瑞卿,冯冲,柏文博,等.两种生防制剂对食用菌杂菌的抑制作用[J].吉林农业科学,2014,39(2):61-64,67.
- [7] 刘勇,张勇,张和平.世界益生菌安全性评价方法[J].中国食品学报,2011(6):22-25.
- [8] 秦艳青,任大勇,李诗语,等.益生菌安全性及风险评估研究进展[J].中国兽药杂志,2012,46(4):51-54.
- [9] 徐丽丹.降血压益生菌的筛选及安全性评价研究[D].哈尔滨:黑龙江大学,2010.
- [10] 周蕊,白瑶,李凤琴.食品工业用益生菌安全性评价研究进展[J].卫生研究,2012(3):29-31.
- [11] 马颖辉,王景会,李玉秋,等.枯草芽孢杆菌淀粉酶高产菌株的复合诱变研究[J].中国酿造,2012(2):53-56.
- [12] 高岩,王景会,李玉秋,等.枯草芽孢杆菌凝乳酶的酶学性质[J].吉林农业大学学报,2012,34(4):385-390.
- [13] 王景会,姜媛媛,王曙文,等.纳豆酱发酵工艺研究[J].中国酿造,2008(7):22-24.
- [14] 王景会,李姝睿,李达,等.枯草芽孢杆菌JAASB4胞外酶修饰对玉米粉成分的影响[J].吉林农业科学,2013,38(6):82-85.

(责任编辑:王昱)