

具有吸附铅能力戊糖片球菌的体内安全性评价

张亮, 于哲, 贺银凤*

(内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 研究了从内蒙古自治区包头市包钢矿区羊粪中分离筛选出具有高抗高吸附重金属铅特性的戊糖片球菌 10-a-1 的安全性。选取清洁级昆明小鼠进行了高、中、低剂量戊糖片球菌 10-a-1 菌液经口灌胃, 阴性对照组灌胃同量的 0.85 g/dL 生理盐水, 阳性对照组采用 40 mg/kg (以体质量计) 环磷酰胺溶液经口灌胃。试验期间观察小鼠的体征、体质量增加量以及摄食量变化, 并比较各组间血清生化指标、精子畸形率、骨髓细胞畸形率、脏器指标及肠黏膜形态的变化。结果表明, 急性毒性试验中小鼠体征正常且无细菌向内脏转移情况发生。小鼠精子畸形试验与红细胞微核试验中阳性对照组突变效果显著, 戊糖片球菌 10-a-1 各剂量组与生理盐水对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。28 d 毒性试验中戊糖片球菌 10-a-1 剂量组小鼠生产性能、脏器指数、血清生化指标、肠黏膜厚度与生理盐水组无显著性差异 ($P>0.05$)。戊糖片球菌 10-a-1 安全、无毒副作用。

关键词: 戊糖片球菌; 急性毒性; 遗传毒性; 28 d 毒性

中图分类号: TS201.3 文章编号: 1673-1689(2023)06-0049-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.007

Safety Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* with Lead Adsorption Capability

ZHANG Liang, YU Zhe, HE Yinfeng*

(School of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: This study evaluated the safety of *Pediococcus pentosaceus* 10-a-1 with high resistance and adsorption properties to heavy metal lead, which was isolated and screened from sheep manure in Baotou Iron and Steel Mining Area, Baotou City, Inner Mongolia Autonomous Region. Clean grade Kunming mice were selected and administered with high, medium, and low doses of *Pediococcus pentosaceus* 10-a-1 by oral gavage. The negative control group was administered with the same amount of 0.85 g/dL physiological saline by oral gavage, and the positive control group was administered with 40 mg/kg cyclophosphamide solution by oral gavage. The changes in physical signs, weight gain and food intake of mice were observed during the experiment. Furthermore, the changes of serum biochemical indexes, sperm malformation rate, bone marrow cell malformation rate, organ index and intestinal mucosa morphology were compared among the groups. The results showed that in the acute toxicity test, the mice showed normal signs and no bacterial translocation occurred in the internal organs. In the mouse sperm abnormality test and erythrocyte micronucleus test, the mutation effect of the positive control group was significant, while no significant difference

收稿日期: 2021-06-10

基金项目: 内蒙古自治区成果转化项目(CGZH2018145)。

* 通信作者: 贺银凤(1960—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳酸菌资源开发利用方面的研究。E-mail: heyinf6468@163.com

was observed between the *Pediococcus pentosaceus* 10-a-1 dose groups and the physiological saline control group ($P>0.05$). In the 28-day toxicity test, there was no significant difference between the *Pediococcus pentosaceus* 10-a-1 dose groups and the physiological saline group in terms of reproductive performance, organ index, serum biochemical indexes and intestinal mucosal thickness ($P>0.05$). Collectively, *Pediococcus pentosaceus* 10-a-1 is discovered to be safe without toxic side effects in use.

Keywords: *Pediococcus pentosaceus*, acute toxicity, genetic toxicity, 28 days toxicity

重金属铅污染与人类活动有密切的关系^[1]。环境中的铅降解缓慢,且易形成化合物附着在土壤表面和水中^[2-3],铅通过生物放大作用影响食品安全进而影响人的健康^[4]。进入人体的铅易蓄积且不易排出,会对人体生殖系统、神经系统等产生损伤^[5]。考虑到铅对环境和人体的危害,需要采取措施将环境和人体中的铅移除^[6]。过去常采用物理化学法去除铅,因其效率低下、价格高昂、操作烦琐,逐渐被微生物修复法所替代^[7]。近些年的研究发现,乳酸菌应用于吸附重金属也有良好的效果,其胞壁成分在吸附重金属方面起关键作用^[8]。

乳酸菌多分布于人与动物肠道中,它们可以调节人与动物肠道的菌群结构和生理功能。同时,一部分乳酸菌还有治疗腹泻、增强免疫力、降血压、治疗抑郁、抗肿瘤等保健和医疗作用^[9-11]。乳酸菌有悠久的历史,一向被认为是安全的(Generally Recognized As Safe, GRAS)。但是,也有研究报道从感染性病变和临床样本中分离出了乳杆菌属、片球菌属和双歧杆菌属^[12-13],这就使得新菌种资源应用于人体或者动物体前进行安全性评价是必要的。

目前对具有吸附重金属铅能力的乳酸菌安全性的研究报道十分少见。为了解该菌株在使用中是否会对人体及动物体产生不良影响,作者测定了戊糖片球菌 10-a-1 对小鼠的急性毒性、遗传毒性和 28 d 毒性,并通过小鼠采样后分析小鼠血液生化指标、脏器指数、生产性能、血生化指标和肠组织的厚度变化,评价其对动物的安全性,以期为新资源的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康昆明小鼠:内蒙古大学实验动物研究中心提供,清洁级,体质量(20 ± 2) g,用于急性毒性试验

与 28 d 毒性试验;体质量(30 ± 2) g,用于遗传毒性试验。

1.2 试验菌株

戊糖片球菌 10-a-1 分离自内蒙古自治区包头市包钢矿区的羊粪中,经鉴定是戊糖片球菌,由内蒙古农业大学食品微生物技术团队测定,菌株 10-a-1 在其最适生长温度 37 °C 和最适 pH 6.5 时对铅的吸附率达到(91.77 ± 1.97)%。随着菌体浓度升高,吸附率随之上升;随着吸附时间的增加,单位菌体吸附量和吸附率也逐渐增加^[14]。

1.3 试验仪器与材料

1.3.1 试验仪器 5810R 型高速低温离心机:德国 Eppendorf;BioTek Epoch 全波长酶标仪:美国 BioTek;SX-500 型高压灭菌锅:日本 Tomy Digital Biology;OLYMPUS BX50 光学显微镜:日本 OLYMPUS;SMART-N 超纯水机:力康生物医疗科技控股有限公司;HWS-26 型电热恒温水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司。

1.3.2 试验材料 姬姆萨稀释液:北京酷来博科技有限公司;1 mL 一次性使用无菌注射器:河南曙光汇知康生物科技股份有限公司;2 mL 一次性真空采血管:石家庄康卫仕医疗器械有限公司;谷草转氨酶测定试剂盒、谷丙转氨酶测定试剂盒、 γ -谷氨酰转肽酶测定试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.4 戊糖片球菌 10-a-1 供试菌液制备

作者按照 GB 15193.3—2014^[15]的规定中的上下法执行,灌胃剂量采用默认计量梯度系数为 3.2,高、中、低剂量组分别为 2、0.555、0.175 mg/g(以体质量计)。取戊糖片球菌 10-a-1 在 37 °C 培养箱培养至第二代,将培养至稳定期的菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,菌泥再用 0.85 g/dL 的生理盐水洗涤 2 遍,菌泥水分质量分数 70% 左右。所得湿菌泥的高、中、低剂量为 6.667、1.850、0.583

mg/g(以体质量计)。灌胃溶剂采用 0.02 mL/g(以体质量计)的 0.85 g/dL 生理盐水,将湿菌泥溶于 0.85 g/dL 生理盐水中。

1.5 急性毒性试验

本实验按照 GB 15193.3—2014^[15]的规定执行。将适应环境 2 d 的健康昆明小鼠分为 2 组,每组 10 只,雌雄各半,分别是对照组和戊糖片球菌 10-a-1 组。对照组用 0.85 g/dL 的生理盐水灌胃,戊糖片球菌 10-a-1 试验组用 6.667 mg/g(以体质量计)的菌液灌胃。灌胃前 1 d 小鼠采取断食不断水饲养方式,灌胃后第 1、3、5、7 d 分别记录小鼠的行为表现及中毒情况。主要指标包括中枢神经系统及躯体运动、自主神经系统、呼吸系统、胃肠系统现象的观察记录。细菌移位试验是在喂养结束后将小鼠处死,摘取心、肝、脾、肾并在无菌环境下切开,用无菌棉签擦拭脏器剖面,涂布于固体 MRS 培养基上,37 ℃培养 48 h,观测是否有细菌生长。如果有菌落生长时,则根据菌落外观、细胞形态、液体培养基生长特性、流动性、革兰氏反应等筛选出具有与本研究菌株相似属性的微生物,提取 DNA 进行 PCR 技术扩增进一步判断是否试验菌株发生细菌移位。

1.6 遗传毒性试验

1.6.1 哺乳动物红细胞微核试验 按照 GB 15193.5—2014^[16]的规定执行。选 7 周龄小鼠,体质量(30±2) g,雌雄性小鼠各 25 只,分为高、中、低共 3 个戊糖片球菌 10-a-1 剂量组和阳性、阴性对照组共 10 组,每组 5 只。阳性采用 40 mg/kg(以体质量计)环磷酰胺经口灌胃,高、中、低剂量组采用 1.2.1 方法制备菌液灌胃;阴性对照组用 0.85 g/dL 生理盐水灌胃。采用 30 h 受试物给予法,第一次给予受试物后的第 24 小时,再次给予受试物 6 h 后采集骨髓样本。骨髓样本用生理盐水冲洗出滴于载玻片上,与小牛血清混匀推片,晾干后用甲醇固定,再使用 Giesma 染色冲片晾干后观察。镜检记录并统计嗜多染红细胞中微核与正染红细胞数量,计算得到微核率。目的菌各剂量组微核率、PCE/NCE 与阴性对照组相比,无统计学意义,则结果应是阴性;有统计学意义,并有明显的剂量反应关系,则结果应是阳性。

1.6.2 小鼠精子畸形试验 按照 GB 15193.7—2003^[17]的规定执行。选 7 周龄雄性小鼠 25 只,体质量(30±2) g,分为阳性、高、中、低、生理盐水对照组共 5 组,每组 5 只。阳性对照采用 40 mg/kg(以体

量计)环磷酰胺经口灌胃,高、中、低剂量组采用 1.2.1 制备菌液灌胃,对照组采用 0.85 g/dL 生理盐水灌胃。在处死前 3 h 按 40 mg/kg(以体质量计)经口灌胃环磷酰胺,将小鼠脱颈处死,小鼠腹部最下端喷少许体积分数 75%乙醇并将其剪开。剥离腹部脂肪可见黄豆粒大小睾丸,将睾丸侧下方附睾取下,漂洗后放入含有 2 mL 的离心管中,将其剪碎,并用移液枪吹打,使精子与生理盐水混匀,再将 4 层擦镜纸过滤的滤液滴于载玻片上,晾干后用甲醇固定,再用体积分数 2%伊红染液染色 1 h。镜检记录并统计目的菌剂量组畸变率与阴性对照组精子畸形的形态以及数量情况,计算得到精子畸形率(%)并将其相比,无统计学意义则结果是阴性;有统计学意义并有明显的剂量反应关系,则结果是阳性。

1.7 28 d 喂养试验

按照 GB 15193.22—2014 的规定执行^[18]。选择健康的 KM 小鼠,雌雄小鼠各 20 只,体质量为(26±2) g,随机分为 4 组,每组 10 只。采用经口灌胃法,按 0.02 mL/g(以体质量计)的 0.85 g/dL 生理盐水作为灌胃溶剂,对照组只使用溶剂灌胃,高、中、低剂量组采用 1.2.1 制备菌液灌胃。喂养试验开始后,每天 09:00 进行灌胃,28 d 连续灌胃并且观察记录小鼠的体质量、采食量。在试验结束后,进行 16 h 断粮不断水的操作,为下一步试验做准备。

1.7.1 小鼠血液生化指标 将 28 d 喂养试验小鼠乙醚麻醉后摘眼球取全血于 EDTA 抗凝管中,3 500 r/min 离心 10 min,取抗凝管上层血清,使用血清生化测定试剂盒测定谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)。

1.7.2 肠黏膜组织学检查 参考文献[19]的方法完成。将 28 d 喂养对照组与试验组的小鼠回肠、盲肠、结肠取 2 cm,用生理盐水将肠道内容物清理后,放入体积分数 4%多聚甲醛固定液中,送往爱博试剂公司进行苏木精-伊红染色和切片,使用光学显微镜上的目镜测微计测量形态学参数。记录上皮细胞高度、绒毛高度、黏膜厚度,每个样本的每个参数随机进行 10 次测量,并将这些测量值的平均值用于统计分析。

1.8 数据分析

试验组内组间重复 3 次,采用 SPSS23.0 和 One-Way(ANOVA)进行统计和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 急性毒性试验

2.1.1 小鼠一般情况 将戊糖片球菌 10-a-1 以 6.667 mg/g(以体质量计)溶解于 0.02 mL/g(以体质量计)的生理盐水中,采用灌胃的方式给予 1 只小鼠受试物,48 h 内小鼠无不良反应和死亡。再取 5 只小鼠以相同的剂量标准进行灌胃,在饲养一周后小鼠全部存活,并且中枢神经系统及躯体运动、自主神经系统、呼吸系统、胃肠系统等指标试验组与对照组相同且全部正常(见表 1),表明该菌株对小鼠半致死量 LD₅₀>6.667 mg/g(以体质量计)。

表 1 急性毒性试验小鼠表现

器官/系统	试验组	对照组
中枢神经系统及躯体运动	动作正常,无震颤,应激反应正常	动作正常,无震颤,应激反应正常
自主神经系统	不流泪,不流鼻涕	不流泪,不流鼻涕
呼吸系统	呼吸正常	呼吸正常
胃肠系统	粪便成型,颜色正常	粪便成型,颜色正常
生殖泌尿系统	无污秽	无污秽
皮肤和毛皮	正常完整不竖毛	正常完整不竖毛
眼	不浑浊	不浑浊

2.1.2 细菌移位试验 作为进入动物体或人体的微生物,首先要考虑其对宿主是否有不利的影响,大量摄入活菌制剂的毒性及其易位性等日益成为人们关注的问题^[20]。细菌易位是一种活细菌穿过肠道屏障定植在周围组织和器官的现象,可引起全身炎症反应、组织损伤、器官衰竭以及机体死亡。在肠外组织中转移、存活和增殖的能力是肠道致病菌引起系统性感染可能性的关键决定因素,通常小鼠感染后 7 d,致病菌向脾脏的移位达到峰值水平,此后开始下降。因此,在喂食益生菌的第七天进行细菌向脾脏移位试验的研究^[21]。将心、肝、脾、肾表面切开后,内部用无菌棉拭子擦拭后的组织液在 MRS 固体培养基上涂布培养 48 h。图 1 所示试验菌株 10-a-1 的 MRS 培养基上未见菌落生长,与阴性对照试验结果相同,证明戊糖片球菌 10-a-1 未发生细菌移位现象。

2.2 遗传毒性试验

遗传毒性是指外部的理化因素直接或间接作

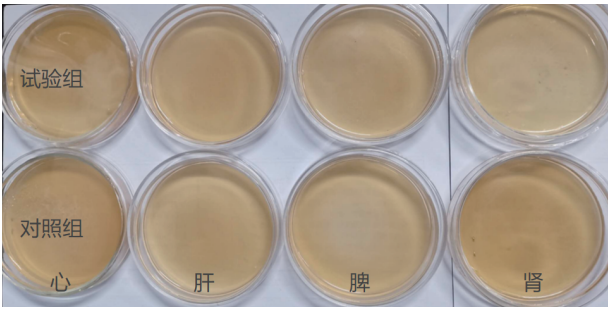


图 1 细菌移位结果

Fig. 1 Bacterial translocation results

用于人体或者动物体,使其遗传物质在染色体、分子和碱基水平受到损伤,这种损伤被认为是可遗传效应的基础,是致癌性的前体^[22]。

2.2.1 小鼠精子畸形试验 通过小鼠精子畸形试验可观察到:在精子接触某种物质一定时间以后,其头部及尾部形态的改变,就可以得到供试物致生殖细胞畸形的能力^[23]。由表 2 可以看出,在观察每个剂量组 5×1 000 个精子后,阳性对照组总的精子畸形个数为 537 个,阳性对照组个体畸形率为 11.46%;戊糖片球菌 10-a-1 各剂量组和生理盐水对照组总精子畸形数 126~141 个,个体畸形率 2.52%~2.82%,各剂量组与阴性对照组无显著性差异($P>0.05$)。说明在试验剂量范围内,小鼠精子畸形试验结果为阴性,戊糖片球菌 10-a-1 对小鼠精子不产生畸变作用。

表 2 小鼠精子畸形试验数据分析表($\bar{x}\pm sd, n=5$)

Table 2 Data analysis of mouse sperm deformity test ($\bar{x}\pm sd, n=5$)

分组	动物数量	观察精子数/个	精子畸形数/个	畸形率%
高剂量组	5	5×1 000	138	2.76±0.58 ^a
中剂量组	5	5×1 000	126	2.52±0.59 ^a
低剂量组	5	5×1 000	141	2.82±0.61 ^a
阴性对照	5	5×1 000	127	2.54±0.67 ^a
阳性对照	5	5×1 000	537	11.46±1.37 ^b

注:同列数据字母相同表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 小鼠红细胞微核试验 微核试验常作为检测染色体或有丝分裂器损伤的一种重要手段,作为致癌作用的重要信号,是遗传毒性评价重要构成部分^[24]。由表 3 可以看出,在观察每个剂量组 5×1 000 个 PCE 后,戊糖片球菌 10-a-1 各剂量组中 PCE 含微核的总数 12~16 个,实验组和阴性对照组微核率

为 0.24%~0.32%, 试验菌在雌雄各剂量组与生理盐水对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 且微核率都在正常范围内。在 PCE/NCE 中和阴性对照组为 0.92~0.93, 目的菌株各剂量组与生理盐水对照组 PCE/NCE 比较无显著性差异 ($P>0.05$)。经口灌胃环

磷酸胺的阳性对照组微核率极显著高于阴性对照组以及试验组 ($P<0.01$)。说明在试验组的剂量范围内戊糖片球菌 10-a-1 未引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率升高, 戊糖片球菌 10-a-1 对小鼠骨髓细胞未见损伤作用。

表 3 小鼠红细胞微核试验数据分析表 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Data analysis of mouse red blood cell micronucleus test ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

性别	分组	观察 PCE 数/个	含微核 PCE 数/个	微核率/%	观察 PCE+NCE 数/个	PCE/NCE
雄性	高剂量组	5×1 000	15	0.30±0.16 ^a	5×200	0.93±0.03 ^a
	中剂量组	5×1 000	15	0.30±0.07 ^a	5×200	0.93±0.04 ^a
	低剂量组	5×1 000	16	0.32±0.13 ^a	5×200	0.93±0.03 ^a
	阴性对照	5×1 000	14	0.28±0.13 ^a	5×200	0.93±0.02 ^a
	阳性对照	5×1 000	209	4.18±0.65 ^b	5×200	0.82±0.03 ^b
雌性	高剂量组	5×1 000	13	0.26±0.15 ^a	5×200	0.92±0.02 ^a
	中剂量组	5×1 000	14	0.28±0.19 ^a	5×200	0.93±0.04 ^a
	低剂量组	5×1 000	12	0.24±0.11 ^a	5×200	0.93±0.03 ^a
	阴性对照	5×1 000	14	0.28±0.15 ^a	5×200	0.93±0.04 ^a
	阳性对照	5×1 000	195	3.90±0.37 ^b	5×200	0.80±0.04 ^b

注: 同列数据字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 28 d 毒性试验

2.3.1 小鼠生产性能分析 连续 28 d 的活菌经口灌胃, 对小鼠进食状况分析, 观察小鼠能否适应大量活菌入侵从而引发炎症反应的发生, 进而影响小鼠的体质量增长、摄食量、料体质量比。由表 4 可以看出, 戊糖片球菌 10-a-1 在小鼠生产性能试验中, 雄性小鼠戊糖片球菌 10-a-1 各剂量组与对照组初始体质量在 (30±2) g, 雌性小鼠戊糖片球菌 10-a-1 各剂量组与对照组初始体质量在 (26±2) g, 当连续灌胃喂养 28 d 后, 终体质量无显著性差异 ($P>0.05$), 小鼠总摄食量试验组与对照组无显著性差异 ($P>$

0.05), 并且各剂量组未见计量依赖关系。雌性中剂量组的体质量增长与摄食量略低于其余试验组, 这可能是在鼠笼摆放位置处于笼架下方, 导致小鼠每日的光照时间不足, 活动量小于其余试验组, 而非雌性小鼠的抵抗力弱于雄性小鼠所致^[29]。雌性小鼠低剂量组的料体质量比大, 可能与小鼠称质量时, 雌性低剂量组在最后, 因为操作导致小鼠受惊吓不进食, 处于饥饿状态有关。但在雌性中剂量试验组增质量、低剂量组料体质量比与对照组的小鼠进食状况中未见统计学差异, 并且雄性试验组与生理盐水正常, 表明戊糖片球菌 10-a-1 菌株具较高安全性。

表 4 小鼠生产性能试验 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 4 Production of mouse performance test ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

性别	组别	只数	初始体质量/g	终体质量/g	增质量/g	摄食量/g	料体质量比
雄性	高剂量组	5	30.56±0.85 ^a	40.50±1.33 ^a	9.94±1.47 ^a	212.160 ^a	21.66±2.79 ^a
	中剂量组	5	30.00±1.04 ^a	40.98±1.96 ^a	10.99±1.09 ^a	216.314 ^a	19.86±1.97 ^a
	低剂量组	5	30.43±2.05 ^a	40.46±1.46 ^a	10.03±0.74 ^a	204.338 ^a	20.45±1.46 ^a
	对照组	5	30.53±1.28 ^a	41.86±0.47 ^a	11.32±1.18 ^a	219.792 ^a	18.68±1.80 ^a
雌性	高剂量组	5	26.95±1.41 ^a	35.12±1.87 ^a	8.17±2.74 ^a	198.188 ^a	21.92±2.80 ^a
	中剂量组	5	26.93±1.99 ^a	34.45±1.24 ^a	7.52±1.55 ^a	174.202 ^a	20.05±1.27 ^a
	低剂量组	5	26.97±1.30 ^a	35.05±2.20 ^a	8.08±1.92 ^a	180.486 ^a	23.23±4.82 ^a
	对照组	5	26.11±1.17 ^a	35.26±0.83 ^a	9.25±0.62 ^a	192.328 ^a	20.87±1.39 ^a

注: 同列数据字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3.2 小鼠脏器指数 心脏指数通常是反应身体健康状况的指标,肾与肝是排毒解毒器官,脾有产生免疫反应的重要功能,血液中抗原在脾中可引起有力的细胞免疫和体液免疫反应^[26-27]。当致病菌入侵时可能会导致器官萎缩或者肿大,通过脏器指数能进行有效观察^[28]。由表 5 可知,戊糖片球菌 10-a-1

灌胃的雄性和雌性的低、中、高剂量组,心、肾、肝、脾占体质量比例与对照组比较,均无显著性差异($P>0.05$)。在雌性与雄性肾体比中,有显著性差异,是因为雄性肾脏所占比例大,不是戊糖片球菌 10-a-1 导致。这些表明戊糖片球菌 10-a-1 对小鼠脏体比无明显影响。

表 5 小鼠脏器指数分析表($\bar{x}\pm sd, n=5$)

Table 5 Analysis of mouse organ index($\bar{x}\pm sd, n=5$)

性别	分组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	空白对照
雄性	心体比	0.005 8 $\pm$ 0.000 6 ^a	0.005 3 $\pm$ 0.000 4 ^a	0.005 3 $\pm$ 0.000 5 ^a	0.005 7 $\pm$ 0.000 2 ^a
	肾体比	0.014 7 $\pm$ 0.001 2 ^a	0.014 7 $\pm$ 0.000 6 ^a	0.014 2 $\pm$ 0.000 3 ^a	0.014 6 $\pm$ 0.000 2 ^a
	肝体比	0.044 9 $\pm$ 0.001 8 ^a	0.045 7 $\pm$ 0.000 7 ^a	0.044 0 $\pm$ 0.001 1 ^a	0.046 3 $\pm$ 0.00 3 ^a
	脾体比	0.002 8 $\pm$ 0.000 3 ^a	0.002 7 $\pm$ 0.000 1 ^a	0.002 8 $\pm$ 0.000 2 ^a	0.002 8 $\pm$ 0.000 1 ^a
雌性	心体比	0.005 6 $\pm$ 0.000 6 ^a	0.005 6 $\pm$ 0.000 8 ^a	0.005 7 $\pm$ 0.000 6 ^a	0.006 1 $\pm$ 0.000 6 ^a
	肾体比	0.012 5 $\pm$ 0.001 ^b	0.012 4 $\pm$ 0.000 8 ^b	0.012 5 $\pm$ 0.000 3 ^b	0.012 4 $\pm$ 0.000 9 ^b
	肝体比	0.046 4 $\pm$ 0.000 8 ^a	0.044 6 $\pm$ 0.002 6 ^a	0.046 3 $\pm$ 0.003 3 ^a	0.046 4 $\pm$ 0.001 7 ^a
	脾体比	0.002 6 $\pm$ 0.000 5 ^a	0.002 7 $\pm$ 0.000 4 ^a	0.002 7 $\pm$ 0.000 3 ^a	0.003 0 $\pm$ 0.000 3 ^a

注:同行数据字母相同表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.3.3 血清生化指标检测 在毒性试验中常以 γ -GT、ALT 和 AST 来反应受试物是否对肝肾功能损害。ALT 和 AST 是参与氨基酸代谢的酶,在肝细胞轻度受损时这 2 种酶活性有明显变化。 γ -GT 是一种转移酶,主要催化谷氨酰基转换反应。 γ -GT 主要存在于肝细胞质微粒体、肝细胞膜的胆汁分泌侧和细小的胆管上皮中,能够催化谷胱甘肽或其他含谷

氨酰基多肽上的谷氨酰基转移到其他合适的受体上去,也是反映肝功能较为敏感的指标^[29-32]。表 6 血液生化指标结果显示,经不同剂量戊糖片球菌 10-a-1 活菌灌胃 28 d 后,血清生化指标 ALT、 γ -GT 与对照组无显著性差异($P>0.05$),证明戊糖片球菌 10-a-1 对小鼠的肝脏细胞无损伤。各剂量组 AST 对照组无显著性差异($P>0.05$),证明对小鼠心肌细胞无损伤。

表 6 小鼠血清生化指标分析表($\bar{x}\pm sd, n=5$)

Table 6 Analysis of serum biochemical indexes of mouse($\bar{x}\pm sd, n=5$)

性别	分组	ALT 酶活/(U/L)	AST 酶活/(U/L)	γ -GT 酶活/(U/L)
雄性	高剂量组	22.12 $\pm$ 2.74 ^a	25.53 $\pm$ 4.54 ^a	35.56 $\pm$ 4.61 ^a
	中剂量组	17.05 $\pm$ 4.13 ^a	27.94 $\pm$ 7.28 ^a	33.38 $\pm$ 3.50 ^a
	低剂量组	18.31 $\pm$ 9.24 ^a	28.27 $\pm$ 3.33 ^a	34.67 $\pm$ 3.46 ^a
	空白对照	18.99 $\pm$ 5.15 ^a	27.17 $\pm$ 3.15 ^a	34.48 $\pm$ 3.53 ^a
雌性	高剂量组	22.14 $\pm$ 5.98 ^a	26.30 $\pm$ 4.28 ^a	34.09 $\pm$ 4.71 ^a
	中剂量组	19.96 $\pm$ 6.63 ^a	27.59 $\pm$ 5.18 ^a	35.47 $\pm$ 3.84 ^a
	低剂量组	16.34 $\pm$ 6.14 ^a	27.49 $\pm$ 4.67 ^a	34.17 $\pm$ 4.11 ^a
	空白对照	17.64 $\pm$ 1.75 ^a	25.09 $\pm$ 3.66 ^a	32.48 $\pm$ 4.56 ^a

注:同列数据字母相同表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.3.4 肠黏膜组织学检查 大多数乳酸菌被认为是安全的,它们存在于人体皮肤表面、口腔和肠道中,而且它们在食品中有着长期的安全使用历史,用于预防或治疗肠道疾病。乳酸菌作为益生菌食品添加剂来增强免疫功能和预防胃肠道感染有着重要的作用。但 Patricia 等人发现^[33],一些双歧杆菌具有胃肠道黏蛋白降解活性,同时有 *afcA* 和 *engBF* 基因存在时分解黏蛋白能力会增强。Salvatore 等人研

究发现 SLAB51 益生菌能使猪肠道黏蛋白发生特异性变化,从而改善了动物的健康状态^[34]。表 7 肠黏膜组织学检查结果显示,在灌胃戊糖片球菌 10-a-1 的各剂量组中,试验组回肠绒毛高度与生理盐水对照组回肠绒毛高度无显著性差异($P>0.05$),试验组与生理盐水对照组回肠、盲肠、结肠的黏膜厚度与上皮细胞高度无显著性差异($P>0.05$),并且黏膜厚度在 30~40 μ m,说明戊糖片球菌 10-a-1 不会对小

表 7 乳酸菌对肠道形态的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 7 Effect of *Lactobacillus* on intestinal morphology ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	回肠			盲肠		结肠	
	绒毛高度/ μm	黏膜厚度/ μm	上皮细胞高度/ μm	黏膜厚度/ μm	上皮细胞高度/ μm	黏膜厚度/ μm	上皮细胞高度/ μm
高剂量组	283.49 $\pm$ 47.96 ^a	245.24 $\pm$ 32.80 ^a	34.78 $\pm$ 4.52 ^a	242.35 $\pm$ 77.71 ^a	36.57 $\pm$ 4.04 ^a	260.22 $\pm$ 52.79 ^a	35.79 $\pm$ 3.91 ^a
中剂量组	292.80 $\pm$ 35.63 ^a	242.35 $\pm$ 26.30 ^a	35.45 $\pm$ 3.16 ^a	241.70 $\pm$ 34.51 ^a	36.38 $\pm$ 6.17 ^a	249.15 $\pm$ 43.57 ^a	37.11 $\pm$ 8.19 ^a
低剂量组	283.36 $\pm$ 35.03 ^a	237.40 $\pm$ 33.11 ^a	34.52 $\pm$ 4.40 ^a	241.62 $\pm$ 47.33 ^a	35.98 $\pm$ 5.19 ^a	249.95 $\pm$ 47.44 ^a	36.17 $\pm$ 4.44 ^a
生理盐水组	294.44 $\pm$ 39.33 ^a	245.90 $\pm$ 50.13 ^a	34.75 $\pm$ 7.46 ^a	245.18 $\pm$ 62.54 ^a	36.47 $\pm$ 3.76 ^a	252.62 $\pm$ 49.59 ^a	36.05 $\pm$ 9.14 ^a

注:同行数据字母相同表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)

鼠的肠道组织产生损伤。

3 结 语

作者对分离自内蒙古自治区包头市包钢矿区羊粪中具有吸附铅能力的戊糖片球菌 10-a-1 进行了包括急性毒性试验、遗传毒性试验和亚慢性毒性试验的小鼠体内试验,通过小鼠一般情况观察、细

菌移位、摄食量、小鼠骨髓微核率、小鼠精子畸形率、小鼠脏器指数、血清生化指标检测、肠黏膜组织学检查等较为全面的安全性评价,证明戊糖片球菌 10-a-1 对动物机体不产生毒害作用,具有较高的安全性,有开发成吸附铅的微生态制剂的潜能,为实际生产应用提供了良好的理论基础。

参考文献:

- [1] GUAN X, SUN L N. Current situation and the harm of soil heavy metal pollution and food safety[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2014, 3547: 612-614.
- [2] 孙娟. 重金属铅污染土壤治理修复的最新研究进展[J]. *中国资源综合利用*, 2020, 38(9): 129-131.
- [3] 杨小俊, 次仁德吉, 吴雪莲, 等. 西藏 4 地市糌粑中重金属含量分析与污染评价[J]. *食品与生物技术学报*, 2023, 42(5): 71-77.
- [4] 乔增运, 李昌泽, 周正, 等. 铅毒性危害及其治疗药物应用的研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(5): 416-420.
- [5] 夏涛, 李晓晶, 李荏, 等. 广州市南沙区居民部分食品中铅、镉含量调查及初步膳食暴露评估[J]. *食品安全导刊*, 2020(27): 118-120.
- [6] 李畅, 贾原博, 赵晓峰, 等. 乳酸菌对重金属吸附作用的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2254-2262.
- [7] 李冉. 泡菜中乳酸菌的分离及其对重金属的吸附作用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [8] KULLISAAR T, SONGISEPP E, AUNAPUU M, et al. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 [J]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 2010, 46(5): 481-486.
- [9] 赵晓峰. 耐铅乳酸菌分离鉴定、吸附特性及机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [10] 关倩倩, 熊涛, 谢明勇. 植物基食品乳酸菌发酵技术研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(7): 1-11.
- [11] 蔚晓敏, 武晓丽, 杨栋, 等. 高田村长寿老人肠道菌群中的抗氧化乳酸菌分离鉴定及评价[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(5): 472-478.
- [12] MORRISON D, WOODFORD N, COOKSON B. Enterococci as emerging pathogens of humans[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 83(S1): 89S-99S.
- [13] 白晓晔, 孙志宏, 张和平. 益生乳酸菌与肠道菌群稳态[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(9): 6-15.
- [14] 李畅. 具有潜在益生特性的乳酸菌对铅吸附特性及吸附机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 急性经口毒性试验: GB/15193.3-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [16] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB/15193.5—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [17] 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 小鼠精子畸形试验: GB/15193.7—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 28 天经口毒性试验: GB/15193.22—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [19] ZHOU J S, GOPAL P K, GILL H S. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus*

- acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2001, 63(1-2):81-90.
- [20] 马娅君, 卢昌文, 陈庆菊, 等. 口服异常毕赤酵母 AR₋(2016)对昆明小鼠生长性能和安全性的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(3):1452-1462.
- [21] GABRIELA P, MARIA E, SUSANA A, et al. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. **Journal of Dairy Research**, 1990, 57(2):255-264.
- [22] CARMEB C M, MANUEL H, YOLANDA S. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains[J]. **Journal of Food Protection**, 2005, 68(2):1034-1040.
- [23] 王芳, 陈松, 刘仁普, 等. 紫斑谷螟豹皮樟虫茶小鼠急性毒性和骨髓红细胞微核试验研究[J]. 山地农业生物学报, 2017, 36(5):58-61.
- [24] SAMEERA N, RAMUNE R. Evaluation of genotoxicity of nanoparticles in mouse models[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2019, 1894:301-312.
- [25] 黄宗锈, 黄佳宁, 钟礼云, 等. 人参组培不定根遗传毒性及亚慢性毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5):389-394.
- [26] 王敏, 罗晓磊, 沈磊, 等. 感染旋毛虫小鼠免疫能力的性别差异研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(1):1-6.
- [27] 张琪琳, 刘小翠, 刘亚鸽, 等. 益肾排毒丸调节 AMPK/ACC 信号通路对 db/db 小鼠肝损伤的保护作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(4):360-366.
- [28] 耿青青, 田祯祥, 张鹤鸣, 等. 跑台运动下大鼠脱钙股骨骨髓适应性节约化和脾脏免疫机能下降对 B 细胞早期发育的影响研究[J]. 中国体育科技, 2021, 57(9):76-81.
- [29] 许女, 贾瑞娟, 李雅茹, 等. 老陈醋来源乳酸菌的益生特性筛选及安全评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10):23-33.
- [30] 苟杨. 竹叶提取物对低温环境下小鼠血生化、肝脏抗氧化和细胞凋亡的影响[D]. 南充: 西华师范大学, 2020.
- [31] NYBLOM H, BERGGREN J, BALLDIN J, et al. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking[J]. **Alcohol and Alcoholism**, 2004, 39(4):336-339.
- [32] 张和平, 张七斤, 孟和毕力格, 等. *L.casei* Zhang 对小鼠 T 淋巴细胞亚群及血清 IgG 和肠黏膜 SIgA 的影响[J]. 中国乳品工业, 2006(10):4-8.
- [33] PATRICIA R M, MIGUEL G, MARIA F G, et al. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008; 74:1936-1940.
- [34] SALVATORE D, MARIA M, GIANLUCA A, et al. Effects of a probiotic on the morphology and mucin composition of pig intestine[J]. **Histology and Histopathology**, 2019, 34(9):1037-1050.