

贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 的逆境耐受能力及安全性分析

邹艳艳, 偶德馨, 董晶晶, 王洋, 叶应旺*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601)

摘要: 该研究分析了拮抗黄曲霉的贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 的逆境耐受能力及安全性, 以期为其被进一步开发应用提供理论基础。通过测定菌株在不同温度 (40、50、60、70、80 °C)、不同质量分数 NaCl (1%、2%、3%、4%、5%、6%、7.5%)、人工胃液 (1、2、3 h)、人工肠液 (2、4、6 h) 下的存活率及药物处理对应的抑菌圈直径, 分析菌株的逆境耐受能力和药敏性, 结果发现: 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 经 80 °C 处理 20 min 存活率为 33.60%; 质量分数 7.5% 的氯化钠处理 2 h 存活率为 19.75%; 人工胃液处理 3 h 存活率为 33.57%; 人工肠液处理 6 h 存活率为 64.24%; 对大多数药物敏感。菌株具有一定的逆境耐受能力和药敏性。通过对小鼠灌胃三种剂量 (10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL) 菌液, 灌胃体积 20 mL/kg·bw, 分析菌株的体内安全性, 结果发现: 菌株灌胃 14 d 对小鼠行为、体质量、食物摄入量、生化指标、血液学指标、脏器指数和组织病理学均无不良影响。综上, 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 具有一定的逆境耐受能力和安全性, 可以进一步开发应用。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1; 黄曲霉; 逆境耐受; 药敏性; 安全性分析

文章编号: 1673-9078(2023)10-119-127

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1359

Analysis of *Bacillus velezensis* YE-1 Stress Tolerance and Safety

ZOU Yanyan, OU Dexin, DONG Jingjing, WANG Yang, YE Yingwang*

(College of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The stress tolerance and safety of *Bacillus velezensis* YE-1, an *Aspergillus flavus* antagonist, were analyzed herein to provide theoretical insights for further research and application of this strain. The survival rates of the strain at different temperatures (40, 50, 60, 70 and 80 °C), NaCl mass fractions (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% and 7.5%), artificial gastric solution exposure (1, 2 and 3 h), and artificial intestinal solution exposure (2, 4 and 6 h) were determined. Additionally, the diameters of the inhibition zones corresponding to drug treatments were measured to assess the stress tolerance and drug sensitivity of the strain. The results showed that the survival rate of *B. velezensis* YE-1 is 33.60% after 20 min treatment at 80 °C; 19.75% after 2 h treatment with 7.5% NaCl; 33.57% after 3 h treatment in artificial gastric fluid; 64.24% after 6 h treatment in artificial intestinal fluid. Moreover, it is sensitive to most drugs. This indicates that the strain has a certain degree of stress tolerance and drug sensitivity. Additionally, the *in vivo* safety of *B. velezensis* YE-1 was evaluated via murine oral gavage studies at three doses (10^7 , 10^8 and 10^9 CFU/mL) in a volume of 20 mL/kg·bw. The results revealed that gavage for 14 days imposed no adverse effects on the behavior, body weight, food intake, biochemical indices, hematological indices, organ indices, or histopathology of the mice. In conclusion, *Bacillus velezensis* YE-1 has a certain degree of stress tolerance and acceptable safety, rendering it a promising candidate for further development and practical application.

Key words: *Bacillus velezensis* YE-1; *Aspergillus flavus*; stress tolerance; drug sensitivity; safety analysis

引文格式:

邹艳艳, 偶德馨, 董晶晶, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 的逆境耐受能力及安全性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 119-127

ZOU Yanyan, OU Dexin, DONG Jingjing, et al. Analysis of *Bacillus velezensis* YE-1 stress tolerance and safety [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 119-127

黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 是引起玉米采后病害

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 安徽省杰出青年基金项目 (2208085J11)

作者简介: 邹艳艳 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学,

E-mail: zouyanyan7844@163.com

通讯作者: 叶应旺 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病微生物

检测与控制, E-mail: yeyingwang04@126.com

的常见病原菌之一, 可以形成高毒性次级代谢产物黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)^[1]。AFB₁ 是一种致癌、致畸、致突变毒素, 污染着世界各地重要的粮食和饲料作物, 对人类和动物健康造成严重威胁^[2-4]。粮食和饲料中的黄曲霉以及随后产生的 AFB₁ 污染是当前国际上食品安全管理面临的一个主要问题^[5,6]。与传统的物理和化学方法相比, 利用生物控制粮食和饲料中的黄曲霉污

染由于低毒、安全、高效而被视为一种非常有前景的方法^[7-9]。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)由于具有较高的抗逆性和良好的环境适应能力而走入大众的视野,已被广泛用作生物防治剂^[10,11]。*Bacillus velezensis*是新发现的需氧、革兰氏阳性、内生孢子*Bacillus*新型细菌菌株^[12]。*Bacillus velezensis*在自然界中分布广泛,可以抑制多种细菌和真菌,它还具有丰富的代谢产物包括抗生素、酶、植物激素、铁螯合剂、抗氧化剂、生长促进剂和抗肿瘤剂^[13-15]。*Bacillus velezensis*已被证明具有多种有益作用,例如,从奶牛粪便中分离出来的*Bacillus velezensis* AD-3产生的脂肽降低了菠菜幼苗枯萎病的严重程度^[16];*Bacillus velezensis* HN-Q-8产生的细菌素被证明可以防治马铃薯赤霉病^[17];*Bacillus velezensis* ZBG17作为肉鸡中抗生素生长促进剂替代品显著提高了肉鸡的饲料利用率和体液免疫反应^[18]。

筛选新的微生物菌株并获得可靠的体内外结果对于扩大益生菌种质资源库非常重要^[19]。Dowarah等^[20]提到,并非所有的微生物都能成为有用的益生菌,这意味着益生菌的成功应用取决于其体内外结果。动物胃肠道中的胆盐、多种酶类和低pH值等隐患对益生菌存在着灭活或抑制作用^[21],而体外结果能够预测它们在不同环境下的体内反应,所以在筛选新菌株时为保证足够的活菌到达肠道、定植于肠道并生长,检测菌株对温度、渗透压、人工胃液和人工肠液的耐受能力显得尤为重要。同时为了确保菌株在体内的安全性,有必要对小鼠进行菌液灌胃处理并通过各种生物指标^[22]评估菌株的体内安全性。

本文以本研究团队自主分离的一株拮抗黄曲霉的贝莱斯芽孢杆菌YE-1为研究对象,体外研究菌株对温度、渗透压、人工胃液和人工肠液的耐受能力及药敏性,然后通过灌胃小鼠对菌株进行体内安全性分析,从而为其被继续研究使用奠定了科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌YE-1分离于地衣中,地衣采集于甘肃省白银市。采用稀释涂布平板法,取1g地衣至5mL无菌水中,涡旋混匀,菌悬液进行不同浓度梯度稀释。取100μL稀释到合适浓度的菌悬液涂布到LB固体培养基(LB肉汤培养基中添加20g/L琼脂粉)上,37℃过夜培养。挑取单菌落,多次划线纯化直至菌落形态单一的菌株,50%甘油(菌液:甘油,1:1,V/V)

保藏备用。取20μL活化的菌液划线于7mm黄曲霉菌丝饼的两侧,25℃培养48h,选取对黄曲霉生长抑制作用最明显的YE-1菌株。使用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒进行菌株基因组DNA提取;对16S rRNA和gyrA基因进行PCR扩增;PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序;测序结果在NCBI网站上进行Blast比对,比对结果为YE-1属于贝莱斯芽孢杆菌。贝莱斯芽孢杆菌YE-1目前保存在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为:CCTCC NO: M 20221143。

1.1.2 化学试剂

Luria-Bertani (LB)肉汤培养基、平板计数培养基(PCA)、猪胆盐,青岛海博生物技术有限公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;0.9%(质量分数)氯化钠注射液(生理盐水),安徽省丰原药业股份有限公司;氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

SHP-80生化培养箱,上海培因实验仪器有限公司;DW-86L416G-80℃低温保藏箱,青岛海尔生物医疗股份有限公司;JBSD-TF270恒温摇床,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;Infinite 200 Pro酶标仪,瑞士TECAN公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株体外逆境耐受能力和药敏性

1.2.1.1 贝莱斯芽孢杆菌YE-1对温度、渗透压耐受能力测定

为了探究菌株对温度的耐受能力,菌株以1%(菌液:LB肉汤培养基,1:100,V/V)的接种量接种到LB肉汤培养基中,37℃过夜培养18h。把装有菌液的1.5mL EP管分别放在40、50、60、70、80℃水浴锅中处理20min,不同温度处理的菌液用生理盐水以10倍梯度稀释到合适浓度,取100μL稀释到合适浓度的菌液涂布在已经凝固的PCA培养基上,倒置在37℃培养箱中培养10h。为了检测贝莱斯芽孢杆菌YE-1对渗透压的耐受能力,菌液以2%(菌液:LB肉汤培养基,2:100,V/V)的接种量接种于含有不同质量分数NaCl(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7.5%)的LB肉汤培养基中处理2h,涂板后37℃厌氧培养12h。采用平板计数法^[23]计数并用下列公式计算菌株的存活率:

$$SR = \frac{\lg N_1}{\lg N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

SR ——为菌株存活率, %;

N_0 ——为对照组活菌数, CFU/mL;

N_1 ——为实验组活菌数, CFU/mL。

1.2.1.2 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对人工胃液和人工肠液耐受能力测定

为了制备人工胃液, 配制氯化钾 (7 mmol/L)、碳酸氢钠 (45 mmol/L)、氯化钠 (125 mmol/L) 和胃蛋白酶 (3 g/L), 用盐酸将 pH 值调到 3.0^[24], 最后用 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤除菌。菌株以 1% (菌液:LB 肉汤培养基, 1:100, V/V) 的接种量接种到 LB 肉汤培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养 18 h 后离心 8 min (6 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 向下层菌体沉淀中加入与离心前菌液相同体积的人工胃液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 培养至 1、2、3 h 分别取出菌液涂板计数。同样, 为了制备人工肠液, 配制胰蛋白酶 (1 g/L)、猪胆盐 (3 g/L), 用氢氧化钠调节 pH 值至 7.5^[25], 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤除菌。把人工肠液加到离心得到的下层菌体沉淀中同样在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 培养至 2、4、6 h 分别取出涂板计算存活率 (计算公式同 1.2.1.1)。以此评估菌株对人工胃液和人工肠液的耐受能力。

1.2.1.3 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 药敏试验

CLSI 纸片扩散法基于经验证的 Kirby-Bauer 法, 根据临床实验室标准研究所 (CLSI) 药物敏感性小组委员会制定的指南操作^[26]。取 100 μL 10^7 CFU/mL 的贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 菌液涂布到已凝固的 LB 固体培养基上, 再将药敏纸片 (赛默飞世尔科技公司) 均匀平放于平板上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 用游标卡尺准确测量抑菌圈直径, 若不存在抑菌圈, 则记录药敏纸片的直径。通过与抗菌圆盘敏感性能标准中提供的区域直径进行比较, 结果以耐药性 (R)、中度敏感性 (I) 和敏感性 (S) 表示。

1.2.2 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 小鼠体内安全性分析

1.2.2.1 菌剂制备

贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 活化培养后, 活化的菌液离心 8 min (6 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 下层菌体沉淀通过加入生理盐水进行重悬。

1.2.2.2 实验动物

昆明系小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 许可证号: SCXK (豫) 2020-0005, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司。

1.2.2.3 实验设计

购买健康小鼠 64 只, 雌雄各半。实验环境适应 5 d 后, 随机分为 8 组, 每组 8 只, 雌/雄性各有一组空白对照组, 实验组各分为三组: 低剂量组

(10^7 CFU/mL)、中剂量组 (10^8 CFU/mL)、高剂量组 (10^9 CFU/mL)^[27]。

1.2.2.4 给药

给药途径为经口灌胃, 灌胃体积为 20 mL/kg·bw, 灌胃菌液前小鼠需禁食 6 h, 小鼠给予灌胃后继续禁食 2 h, 连续灌胃 14 d, 小鼠喂养期间自由饮水。

1.2.2.5 观察指标

(1) 临床观察: 观察所有小鼠是否出现步态异常、嗜睡、毛发、眼睛、皮肤、流涎和局部损伤中毒迹象^[28], 特别注意小鼠有无震颤、惊厥、腹泻、昏迷和旋转节律性运动^[29]。

(2) 小鼠体质量和食物摄入量: 每日给小鼠灌胃菌液前称量其体质量并记录下来。记录并用下列公式计算小鼠本次灌胃后给食到下一次开始禁食这段时间的食物摄入量。

$$FI = \frac{D_1 - D_0}{C} \quad (2)$$

式中:

FI ——为食物摄入量, g;

D_1 ——为每日食物添加量, g;

D_0 ——为每日食物剩余量, g;

C ——为每笼鼠数量, 只。

(3) 生化指标和血液学指标: 小鼠灌胃菌液 14 d 结束后过夜禁食, 解剖当天通过摘眼球取血。小鼠全血在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 4 h 后, 在离心机中离心 15 min (3 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 上层血清用市售试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 进行生化指标测定。尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CRE) 用于评价肾功能状况; 直接胆红素 (D-BIL) 和总胆红素 (T-BIL) 用于评价肝功能状况; 总胆固醇 (T-CHO)、葡萄糖 (GLU) 和甘油三酯 (TG) 分别用于评价胆固醇、血糖和血脂情况。将每组小鼠的全血保存在 EDTA (K_2) 微量采血管中并尽快送至武汉塞维尔生物公司进行血液学参数检测。

(4) 小鼠解剖学和病理学检查: 用颈椎脱位法处死并解剖小鼠, 检查心、肺、肠、胃、肝、胸腺和其它器官是否异常水肿或充血; 称量每只小鼠心、肝、脾、肺、肾的质量, 并用下列公式计算脏器指数; 肝脏和肾脏染色后进行组织病理学观察。

$$OV = \frac{W_1}{W_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

OV ——为脏器指数, %;

W_0 ——为鼠处死前体质量, g;

W_1 ——为脏器质量, g。

1.3 数据分析

使用 GraphPad Prism (8.3.0) 进行数据分析并作图。对获得的实验结果进行单因素方差分析 (ANOVA), 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 (SD)。 $P<0.05$ 具有显著差异, $P<0.01$ 具有高度显著差异。

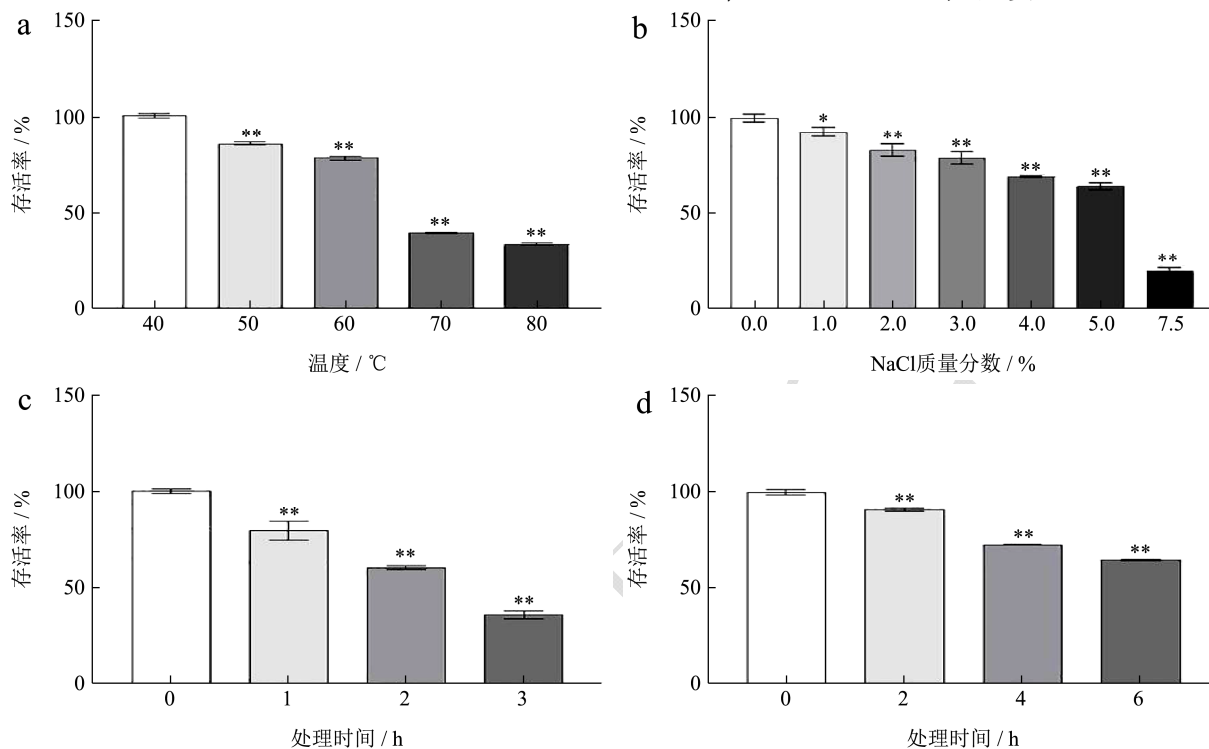


图1 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对温度、渗透压、人工胃液及人工肠液的耐受性结果

Fig.1 Results of *Bacillus velezensis* YE-1 tolerance to temperature, osmotic pressure, artificial gastric fluid, and artificial intestinal fluid

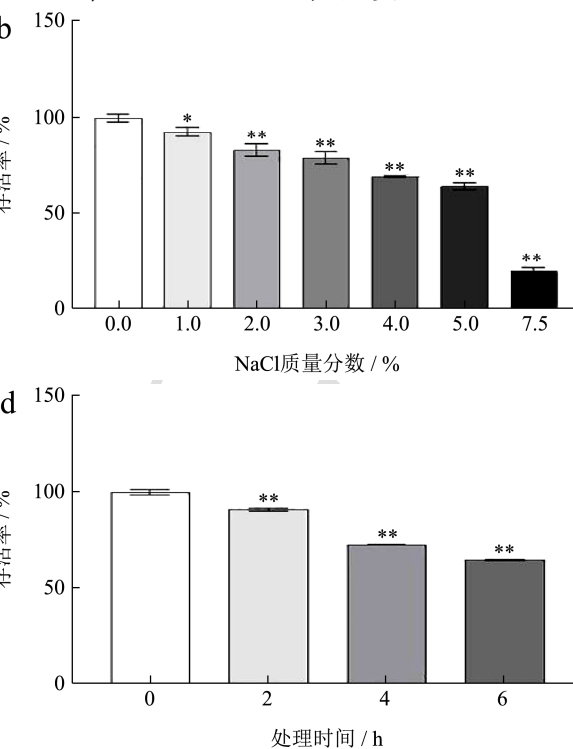
注: a 为菌株对温度耐受性结果图, b 为菌株对渗透压耐受性结果图, c 为菌株对人工胃液耐受性结果图, d 为菌株对人工肠液耐受性结果图。*各组与对照组比较 $P<0.05$, **各组与对照组比较 $P<0.01$ 。

制粒是饲料加工中的重要工序, 操作温度可以达到 80 °C。本研究选用 40、50、60、70、80 °C 的处理温度, 探究菌株对温度的耐受能力。此外, 渗透压对微生物影响极大, 微生物在高渗环境下会发生质壁分离而导致死亡。本研究以质量分数分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7.5% 的处理环境模拟菌株在食品加工过程中可能遇到的高渗透压环境, 观察菌株对渗透压的耐受能力。菌株对温度和渗透压的耐受结果如图 1a、b 所示, 菌株的存活率随温度和氯化钠质量分数的升高呈下降趋势, 但经 80 °C 处理 20 min 菌株存活率仍能达到 33.60%, 质量分数 7.5% 的氯化钠溶液处理 2 h 存活率是 19.75%, 此结果与 Ragul 等^[30]对从传统盐水泡菜中分离的芽孢杆菌进行益生菌特性的研究结果类似, 我们可知贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对高温和渗透压的耐受能力较好。对胃肠道的耐受性是菌株最重要的益生特性之一, 菌株能够耐受人工胃液和肠液, 才能在体内定植从而发挥作用。参考食物在动物

2 结果与讨论

2.1 菌株体外逆境耐受能力和药敏性

2.1.1 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对温度、渗透压、人工胃液及人工肠液的耐受能力



胃肠道中的停留时间, 选定人工胃液处理时间为 1、2、3 h, 人工肠液处理时间为 2、4、6 h, 检测贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对人工胃液和肠液的耐受能力。结果如图 1c、d, 在 pH 值 3.0 的模拟人工胃液中处理 3 h 菌株存活率是 33.57%, 在含有 3 g/L 猪胆盐的模拟人工肠液中处理 6 h 存活率是 64.24%, 实验数据表明贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 耐人工胃液并对人工肠液的耐受能力较强, 此结果为其在体内定植并发挥作用奠定了基础。以上实验结果与前人研究得到益生菌能够耐受人工胃液和肠液的结果一致^[31]。

2.1.2 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 药敏实验

由于耐药基因在质粒上, 质粒介导的共轭转移是微生物间传播耐药基因最常见、最有效的方式, 从而造成耐药性的水平传播^[32]。因此, 应将药物敏感性视为益生菌安全性评估的重要工具。药物敏感性测试使用头孢类的头孢西丁、头孢唑啉和头孢曲松, 碳青霉烯类的亚胺培南和美洛培南, 氨基糖苷类的阿米卡星、

链霉素和妥布霉素,糖肽类的万古霉素,喹诺酮类的环丙沙星、诺氟沙星和萘啶酸,四环素等 13 中抗生素。根据实验得到的抑菌圈直径对比结果可知(表 1),贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对其接触的 10 种药物敏感,对头孢曲松耐药,妥布霉素和美洛培南中度敏感,实验结果表明贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对大多数药物敏感,该结果与 Jeon 等^[33]研究发现 *Bacillus subtilis* P223 仅对八种药物中的链霉素耐药的的结果类似。菌株对大多数药物敏感,说明菌株含有的耐药基因较少,从而降低了耐药基因传播可能带来的风险。

表 1 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 药敏性实验结果

名称	用量/ μg	测试指标(抑菌圈, mm)			抑菌圈/mm	敏感性
		R	I	S		
头孢西丁	30	≤ 23	24-27	≥ 28	28.45 ± 0.09	S
头孢唑啉	30	≤ 14	15-17	≥ 18	22.79 ± 0.85	S
头孢曲松	30	≤ 24	25-26	≥ 27	12.29 ± 0.20	R
亚胺培南	10	≤ 13	14-15	≥ 16	34.75 ± 0.33	S
美洛培南	10	≤ 15	16-19	≥ 19	18.47 ± 0.10	I
阿米卡星	30	≤ 14	15-16	≥ 17	22.43 ± 0.39	S
链霉素	10	≤ 11	12-14	≥ 15	19.38 ± 0.59	S
妥布霉素	10	≤ 12	13-14	≥ 15	14.42 ± 0.23	I
万古霉素	30	≤ 14	15-16	≥ 17	17.86 ± 0.05	S
环丙沙星	5	≤ 15	16-20	≥ 21	24.76 ± 0.13	S
诺氟沙星	10	≤ 12	13-16	≥ 17	22.54 ± 0.43	S
四环素	30	≤ 14	15-18	≥ 19	29.32 ± 1.02	S

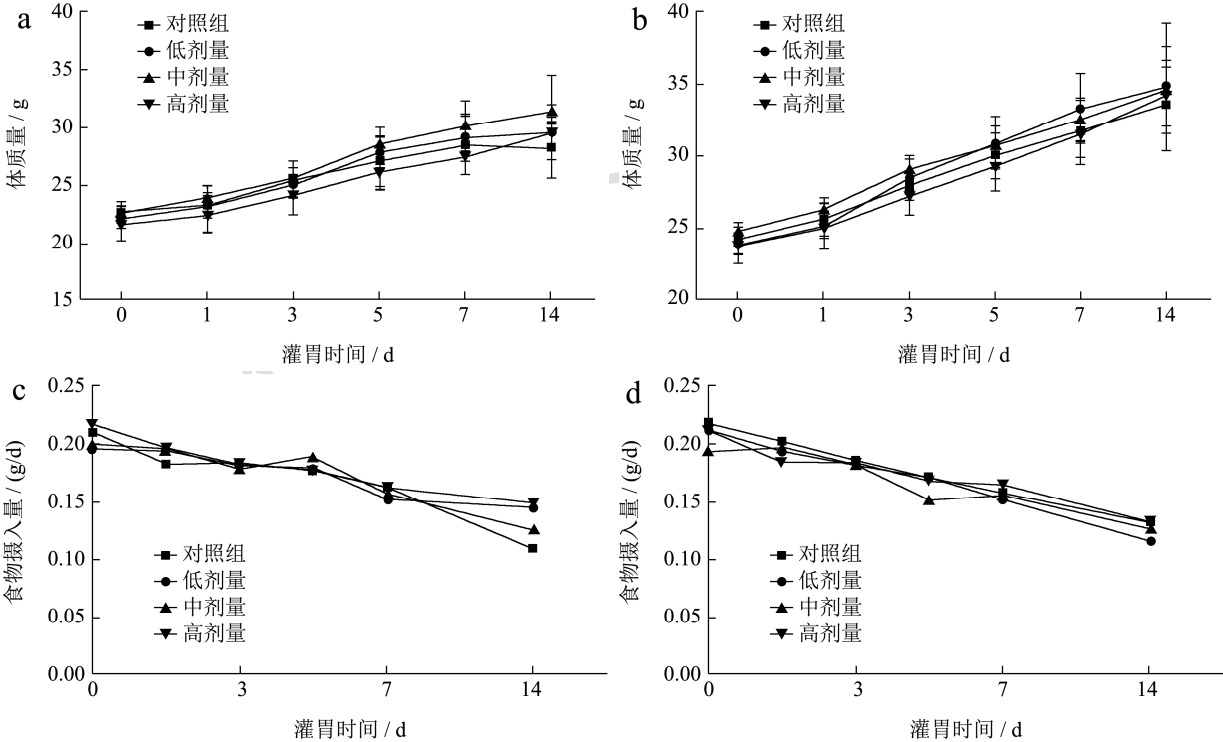


图 2 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠体质量和食物摄入量的影响

Fig.2 Effect of *Bacillus velezensis* YE-1 on body weight and food intake of mice

注: a、b 分别为雌性、雄性小鼠 14 d 体质量变化图, c、d 分别为雌性、雄性小鼠 14 d 食物摄入量变化图。

血液系统是有毒物质最敏感的靶点之一^[35]。高、中、低浓度菌液灌胃小鼠 14 d, 各组小鼠血清生化结果如图 3 所示, 雌/雄性小鼠处理组与对照组的各项生化结果均不存在显著差异, 说明高、中、低浓度菌液对小鼠肝功能、肾功能、胆固醇、血糖、血脂水平均没有不良影响, 此结果与 Sahnoun 等^[36]发表的报告一致, 报告称 *Bacillus subtilis* SPB1 不会对小鼠生化指标有任何负面影响。图 4 为血液学参数检测结果, 与对照组相比, 处理组小鼠的血小板数目有显著差异 ($P<0.05$), 但该指标无剂量依赖关系, 结合处理组与对照组没有显著不同的其它 16 项血液学指标结果, 综合分析可知, 处理组小鼠血小板数目的显著变化不具有生物学上的意义和毒理学上的意义。由此表明, 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠生化指标和血液学指标均没有不良作用。

2.2.3 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠脏器指数和组织病理学的影响

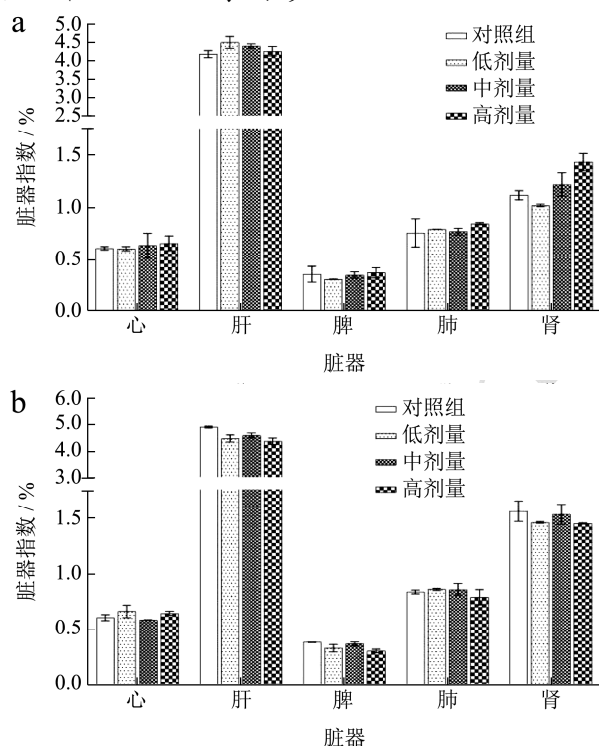


图 5 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠脏器指数的影响

Fig.5 Effect of *Bacillus velezensis* YE-1 on organ coefficients in mice

注: a 为雌性小鼠脏器指数结果, b 为雄性小鼠脏器指数结果。

解剖小鼠后, 各组小鼠的脏器均未发现异常水肿或充血等明显病理改变, 此结果与 Metlakunta 等^[37]在对 *Bacillus coagulans* SNZ 1969 的安全性评价中, 解剖大鼠在任何组织中均未发现任何重大毒性反应的结果一致。长期以来, 对照组和处理组小鼠脏器指数的

比较被认为是实验动物脏器化学诱导变化和毒理学效应的敏感指标^[38], 如图 5 所示, 小鼠处理组与对照组的各项脏器指数均无显著差异, 说明贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠脏器无不良影响。由于肝脏和肾脏是重要的排毒器官^[39], 我们重点检测肝脏和肾脏的组织病理学变化。结果如图 6 所示, 肝脏和肾脏的病理切片中没有肿胀、坏死、变性、炎症变化或细胞浸润; 肝脏病理组织切片显示, 对照组与处理组的肝细胞形状规则, 结构完整, 核圆, 中央静脉未见充血和扩张; 肾脏病理切片显示, 对照组和处理组的肾小体和肾小管细胞结构清晰, 肾小体上皮细胞和肾近曲小管上皮细胞均无充血现象且细胞结构清晰完整。肝脏和肾脏未见病理异常的结果与肉眼观察结果一致, 此结果也与血液学结果和生化结果一致, 上述结果一致表明贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠的重要器官肝脏和肾脏无毒性作用。

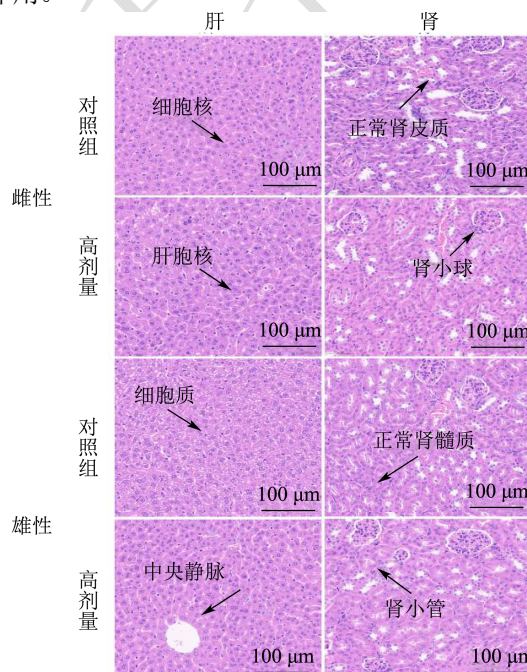


图 6 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对小鼠肝肾组织病理学的影响

Fig.6 Effect of *Bacillus velezensis* YE-1 on histopathology of mouse liver and kidney (200×)

3 结论

论文以本实验室分离的一株拮抗黄曲霉的贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 为研究对象, 通过体外实验分析贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 的逆境耐受能力和药敏性, 并在小鼠体内对其进行安全性分析。实验结果表明贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 对高温和渗透压耐受能力较好、耐人工胃液并对人工肠液的耐受能力较强; 对大多数药物敏感; 高、中、低浓度菌液灌胃 14 d 未给小鼠带来行为、体质量、食物摄入量、生化指标、血液学指标、脏器

指数、肝肾组织结构的任何不良影响。因此, 贝莱斯芽孢杆菌 YE-1 应被视为具有一定逆境耐受能力且具有安全性的细菌被进一步开发应用。

参考文献

- [1] Perrone G, Haidukowski M, Stea G, et al. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. Flavi from maize in Nigeria and Ghana [J]. Food Microbiol, 2014, 41(1): 52-59.
- [2] Lewis L, Onsongo M, Njapau H, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya [J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(12): 1763-1767.
- [3] Naseem M N. Hematological and serum biochemical effects of aflatoxin B1 intoxication in broilers experimentally infected with fowl adenovirus-4 (FAdV-4) [J]. Pakistan Veterinary Journal, 2018, 38(2): 209-213.
- [4] Rudramurthy S M, Paul R A, Chakrabarti A, et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management [J]. J Fungi (Basel), 2019, 5(3): 55.
- [5] Chain E, Schrenk D, Bignami M, et al. Risk assessment of aflatoxins in food [J]. EFSA J, 2020, 18(3): e06040.
- [6] Almaghrabi M A. The occurrence of aflatoxins in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) worldwide [J]. Journal of Food Quality, 2022, 3: 1-9.
- [7] Kumar P, Mahato D K, Kamle M, et al. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management [J]. Front Microbiol, 2016, 7(1): 2170.
- [8] Ren X, Zhang Q, Zhang W, et al. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(1): 24.
- [9] Ul Hassan Z, Al Thani R, Alnaimi H, et al. Investigation and application of *Bacillus licheniformis* volatile compounds for the biological control of toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp [J]. ACS Omega, 2019, 4(10): 17186-17193.
- [10] Penha R O, Vandenbergh L P S, Faulds C, et al. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations [J]. Planta, 2020, 251(3): 70.
- [11] Perez-Garcia A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture [J]. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(2): 187-193.
- [12] Ye M, Tang X, Yang R, et al. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis* [J]. ACS Chem Biol, 2018, 13(3): 500-505.
- [13] Adeniji A A, Loots D T, Babalola O O. *Bacillus velezensis*: Phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(9): 3669-3682.
- [14] Monzon-Atienza L, Bravo J, Torrecillas S, et al. Isolation and characterization of a *Bacillus velezensis* D-18 strain, as a potential probiotic in European seabass aquaculture [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2021, 13(5): 1404-1412.
- [15] Xiong Z R, Cobo M, Whittall R M, et al. Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey [J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0266470.
- [16] Sugiyama T, Natsuaki K T, Tanaka N, et al. Antagonism of *Bacillus velezensis* isolate from anaerobically digested dairy slurry against fusarium wilt of spinach [J]. Agronomy, 2022, 12(5): 1058.
- [17] Zhao J, Zhou Z, Bai X, et al. A novel of new class II bacteriocin from *Bacillus velezensis* HN-Q-8 and its antibacterial activity on *Streptomyces scabies* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13(7): 1058.
- [18] Soni R, Keharia H, Bose A, et al. Genome assisted probiotic characterization and application of *Bacillus velezensis* ZBG17 as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler chickens [J]. Genomics, 2021, 113(6): 4061-4074.
- [19] Giang H H, Viet T Q, Ogle B, et al. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii* [J]. Livestock Science, 2012, 143(2-3): 132-141.
- [20] Dowarah R, Verma A K, Agarwal N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review [J]. Anim Nutr, 2017, 3(1): 1-6.
- [21] Boricha A A, Shekh S L, Pithva S P, et al. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin [J]. Lwt, 2019, 106(2): 201-208.
- [22] Bernardeau M, Lehtinen M J, Forssten S D, et al. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality [J]. J Food Sci Technol, 2017, 54(8): 2570-2584.
- [23] Cunningham A. Note on the plate method for enumeration of bacteria [J]. J Hyg (Lond), 1914, 13(4): 433-437.
- [24] Jacobs R D, Gordon M B E, Vineyard K R, et al. The effect

- of a seaweed-derived calcium supplement on gastric juice pH in the horse [J]. *J Equine Vet Sci*, 2020, 95(9): 103265.
- [25] Zhang Y, Wu T, Chen Z, et al. Dietary supplementation with *Enterococcus faecium* R1 attenuates intestinal and liver injury in piglets challenged by lipopolysaccharide [J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11(5): 1424.
- [26] Ghannoum M. Update on antifungal susceptibility: CLSI focus [J]. *Pathology*, 2017, 49(2): S1.
- [27] Sorokulova I B, Pinchuk I V, Denayrolles M, et al. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(4): 954-963.
- [28] Lazarenko L M, Babenko L P, Gichka S G, et al. Assessment of the safety of *Lactobacillus casei* IMV B-7280 probiotic strain on a mouse model [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2021, 13(6): 1644-1657.
- [29] Fereidoun H. Nervous signs of salt poisoning in Wistar rats [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2014, 96(1): 162-170.
- [30] Ragul K, Syiem I, Sundar K, et al. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle [J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54(13): 4473-4483.
- [31] Mazzantini D, Celandroni F, Calvigioni M, et al. Microbiological quality and resistance to an artificial gut environment of two probiotic formulations [J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2781.
- [32] Tao S, Chen H, Li N, et al. The spread of antibiotic resistance genes *in vivo* model [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022, 7: 3348695.
- [33] Jeon H L, Lee N K, Yang S J, et al. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26(6): 1641-1648.
- [34] Chaudhari K, Mohan M, Saudagar P, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Bacillus coagulans* SKB LAB-19 (MCC 0554) in humans and animal healthcare [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2022, 133(7): 105218.
- [35] Ferrario D, Croera C, Brustio R, et al. Toxicity of inorganic arsenic and its metabolites on haematopoietic progenitors "*in vitro*": Comparison between species and sexes [J]. *Toxicology*, 2008, 249(2-3): 102-108.
- [36] Sahnoun R, Mnif I, Fetoui H, et al. Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant toxicity towards mice [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2014, 20(3): 333-340.
- [37] Metlakunta A S, Soman R J. Safety evaluation of *Bacillus coagulans* SNZ 1969 in Wistar rats [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2020, 110(11): 104538.
- [38] Arck P, Handjiski B, Hagen E, et al. Is there a 'gut-brain-skin axis'? [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(5): 401-405.
- [39] Oliviero F, Lukowicz C, Boussadia B, et al. Constitutive androstane receptor: A peripheral and a neurovascular stress or environmental sensor [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2426.