

## 论著

## 生孢梭菌代谢产物对 ICR 小鼠的毒性研究

董银苹, 韩春卉, 江涛, 张宏元, 王佳慧, 韩小敏, 甘辛, 白莉, 王伟, 胡豫杰, 李凤琴, 徐进  
(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:**目的 研究生孢梭菌代谢产物对 ICR 小鼠的毒性作用。方法 将分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品样品中的生孢梭菌分别培养在庖肉肉汤及 TPGY 肉汤培养基中, 将过滤除菌及处理后的培养液分别经灌胃和腹腔注射给予 ICR 小鼠, 观察其中毒及死亡情况。结果 生孢梭菌培养液及处理后的培养液经腹腔注射 ICR 小鼠后均对其有毒性作用, 中毒症状表现为小鼠急促呼吸后猝死, 死亡时间多集中在 10 min 内, 平均为 5~7 min, A-F 多价抗肉毒毒素诊断血清对小鼠无保护作用。结论 生孢梭菌代谢产物中含有不同于肉毒毒素的有毒代谢产物, 腹腔注射可导致 ICR 小鼠猝死。

**关键词:**生孢梭菌; 乳清蛋白粉; 代谢产物; 毒性试验; 食品安全; ICR 小鼠

中图分类号: R155; S852.61+6.3; S859.82 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0414-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.05.002

### To study the toxic effect of the culture supernatant produced by *Clostridium sporogenes* in ICR mice

DONG Yin-ping, HAN Chun-hui, JIANG Tao, ZHANG Hong-yuan, WANG Jia-hui, HAN Xiao-min,  
GAN Xin, BAI Li, WANG Wei, HU Yu-jie, LI Feng-qin, XU Jin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for  
Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** In order to study the toxicity of the culture supernatant of *Clostridium sporogenes*. **Methods** Strains of *C. sporogenes* was isolated from the whey protein concentrate (WPC) and its products. The culture supernatant of *C. sporogenes* reached maximum in the early stationary phase of the bacterial growth in cooked meat medium or trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth that contained rich glucose, ammonia and peptide. The culture supernatant of *C. sporogenes* and treated culture supernatant are injected to ICR mice intraperitoneally or by oral perfusion. The death of ICR was recorded. **Results** Intraperitoneal (i. p.) injection of the culture supernatant caused death of ICR mice. ICR mice showed slow the poisoning symptoms, including irritable, hair arched and shortness of breath and sudden death within 10 min, the average 5 to 7 min. The toxic effect of the culture supernatant produced by *C. sporogenes* is different from botulinum toxin poisoning. **Conclusion** With the notable exception of production of botulinum neurotoxin, the isolation of *C. sporogenes* from WPC and its products suggest that the culture supernatant of *C. sporogenes* have the potential toxicity to be present in mice.

**Key words:** *Clostridium sporogenes*; whey protein concentrate; metabolic product; toxicity assay; food safety; ICR mice

2013年8月3日,国际食品安全当局网络通报了“新西兰乳制品企业在浓缩乳清蛋白粉中检出肉毒梭菌”的消息,新西兰某企业在接受客户请求检测肉毒毒素的过程中,从其生产的浓缩乳清蛋白粉中检出芽孢微生物,其代谢产物显示了对实验动物毒性,由此怀疑乳清蛋白粉产品中可能受到肉毒梭菌污染,并上报新西兰政府部门,由此引发全球

范围内该企业生产的问题乳清蛋白粉及用问题乳清蛋白粉生产的乳制品大批量召回,受污染的芽孢微生物后经鉴定为生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)。生孢梭菌和肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)在生化特征、遗传学特性方面非常相似,二者的区别在于生孢梭菌不会产生肉毒毒素。有报道<sup>[1-3]</sup>生孢梭菌也可以产生不同于肉毒毒素的其他有毒代谢产物。目前国内对生孢梭菌的研究很少,其致病性罕见报道,本文对从浓缩乳清蛋白粉及其制品样品中分离到的生孢梭菌开展了对ICR小鼠的毒力研究,为评估乳制品中污染生孢梭菌风险性提供技术支持。

收稿日期:2014-07-02

作者简介:董银苹 女 助理研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: dongyiping@cfssa.net.cn

通讯作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: xujin@cfssa.net.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验菌株

生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) 试验株来源:由国家食品安全风险评估中心分离自 78 份浓缩乳清蛋白粉及其制品样品,其中包括 2 份浓缩乳清蛋白粉样品、34 份婴幼儿配方粉样品、42 份含乳饮品。菌株通过表型特征、生化特性、分子生物学和蛋白质谱特征等综合分析,鉴定为生孢梭菌。

生孢梭菌标准株 (CICC 10385) 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

庖肉肉汤 (cooked meat medium) 及 TPGY (trypticase-peptone-glucose-yeast extract) 肉汤购自北京陆桥技术责任有限公司,哥伦比亚血琼脂平板(上海梅里埃生物工程有限公司),0.45 μm 滤器(美国 pall),胰酶(活力 1:250,批号:1227385,美国 Gibco),A-F 多价抗肉毒毒素诊断血清(军事医学科学院),恒温培养箱(型号:222L,德国 MMM Incucell),生物安全柜(型号:logic 6 B2,美国 Labconco),冷冻离心机(型号:CR22E,日本日立),厌氧培养装置(GENbox 7.0L,GENbox anaer 96124,法国 Biomerieux)。

#### 1.1.3 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠,雌性,体重 12 ~ 15 g[北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],于中国医学科学院医药生物技术研究所饲养[合格证号:SYXK(京)2012-0021]。动物饲养条件:室温 20 ~ 23 °C,相对湿度为 40% ~ 60%,昼夜交替时间为 10/14(h)的条件下,给予常规饲料适应 3 d 后,按体重随机分组,3 只/笼,自由进食饮水。

#### 1.1.4 生孢梭菌培养液的制备

生孢梭菌分离株接种哥伦比亚血琼脂平板,置于(35 ± 1) °C 厌氧培养 72 h,挑取哥伦比亚血琼脂平板上生长的单菌落分别接种到庖肉肉汤及 TPGY 肉汤培养基内。庖肉肉汤培养基置于(35 ± 1) °C 厌氧培养,TPGY 肉汤培养基置于(28 ± 1) °C 厌氧培养,均培养 5 d 后取培养液离心,取上清液,经 0.45 μm 滤膜过滤,过滤好的庖肉肉汤培养液和 TPGY 肉汤培养液作为生孢梭菌原液组备用。取部分上述制备好的庖肉肉汤和 TPGY 肉汤培养液滤液 100 °C 加热 10 min,冷却后作为生孢梭菌加热处理组备用,同样取部分上述制备好的庖肉肉汤和 TPGY 肉汤培养液滤液经 10% 胰酶处理后作为胰酶处理组备用<sup>[4-5]</sup>。

生孢梭菌 (CICC 10385) 培养液的制备同上处理。肉毒梭菌庖肉肉汤培养液(含肉毒毒素)同上

述处理,作为肉毒毒素阳性对照组备用。

### 1.2 方法

根据培养基及培养物处理方式不同,本试验设置生孢梭菌分离株试验组、生孢梭菌标准菌株 (CICC 10385) 对照组、肉毒梭菌阳性对照组、培养基空白对照组。分别经灌胃和腹腔注射给予 ICR 小鼠。腹腔注射组的处理:每只小鼠经腹腔注射给予步骤 1.1.4 制备好的相应培养液 0.5 ml,观察 4 d;经口灌胃组处理:每只小鼠经口灌胃给予步骤 1.1.4 制备好的相应培养液 0.5 ml,观察 4 d;上述试验重复 2 次。

## 2 结果

庖肉肉汤和 TPGY 肉汤是肉毒梭菌产生肉毒毒素的培养基,由表 1 可知,庖肉肉汤和 TPGY 肉汤空白对照组均不会导致小鼠中毒和死亡,即腹腔注射和经口灌胃给予庖肉肉汤或 TPGY 肉汤均不会导致小鼠非特异性死亡,试验所使用的庖肉肉汤和 TPGY 肉汤培养基对 ICR 小鼠无毒性。分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品的生孢梭菌和生孢梭菌标准株 (CICC 10385) 在庖肉肉汤培养基培养后,其代谢产物经口灌胃给予小鼠后可引起小鼠轻微的中毒表现,主要表现

表 1 生孢梭菌及肉毒梭菌培养液经不同途径给予 ICR 小鼠后反应情况

Table 1 Mice tested in the toxic effect of the culture supernatant produced by *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum*

试验分组	培养基	培养物的处理	腹腔注射		经口灌胃	
			动物数 /只	死亡数 /只	动物数 /只	死亡数 /只
生孢梭菌 分离株组	庖肉肉汤	原液	3	3	3	0 <sup>d</sup>
		抗诊断血清 <sup>a</sup>	3	3	—	—
		加热处理 <sup>b</sup>	3	3	—	—
		胰酶处理 <sup>c</sup>	3	3	—	—
生孢梭菌 标准株组 (CICC 10385)	TPGY 肉汤	原液	3	0	3	0
		加热处理 <sup>b</sup>	3	0	—	—
		胰酶处理 <sup>c</sup>	3	0	—	—
		原液组	3	3	3	0 <sup>d</sup>
生孢梭菌 标准株组 (CICC 10385)	庖肉肉汤	抗诊断血清 <sup>a</sup>	3	3	—	—
		加热处理 <sup>b</sup>	3	3	—	—
		胰酶处理 <sup>c</sup>	3	3	—	—
		原液	3	0	3	0
肉毒毒素 阳性对照组	TPGY 肉汤	加热处理 <sup>b</sup>	3	0	—	—
		胰酶处理 <sup>c</sup>	3	0	—	—
		原液	3	3	—	—
		抗诊断血清 <sup>a</sup>	3	0	—	—
培养基空 白对照组	庖肉肉汤	加热处理 <sup>b</sup>	3	0	—	—
		胰酶处理 <sup>c</sup>	3	3	—	—
		原液	3	3	—	—
		空白对照	3	0	0	0
培养基空 白对照组	TPGY 肉汤	加热处理 <sup>b</sup>	3	0	—	—
		空白对照	3	0	0	0

注:a 为培养液原液与 A-F 多价抗肉毒毒素诊断血清等量混合,37 °C 作用 30 min 后腹腔注射小鼠,每只 0.5 ml,观察 96 h;b 为培养液原液经 100 °C 加热 10 min;c 为每 9 份培养液原液加 10% 胰酶水溶液 1 份;d 为小鼠中毒症状较轻,主要表现为精神不振,2 h 后恢复;—为小鼠不进行此项试验

为精神不振,但2 h后可恢复。该代谢产物经加热处理及10%胰酶处理后经腹腔注射途径给予小鼠,均可导致小鼠短时间内死亡,并且腹腔注射A-F多价抗肉毒毒素诊断血清后仍可导致小鼠死亡,即A-F多价抗肉毒毒素诊断血清对小鼠的死亡无保护作用,TPGY肉汤培养基培养后,其代谢产物经上述步骤后未出现小鼠中毒及死亡表现。

由表2可知,生孢梭菌分离株和生孢梭菌标准株(CICC 10385)在庖肉肉汤培养基中培养产生的代谢产物中存在不同于肉毒毒素,且对热处理稳定的毒性代谢产物,ICR小鼠腹腔注射该毒性代谢产物对其有致死作用。生孢梭菌代谢产物对小鼠致死前症状主要表现为:小鼠行动迟缓或烦躁不安、呼吸急促及被毛耸起,呈现中毒症状,急促呼吸后猝死,多在10 min内死亡,平均5~7 min,中毒特点与肉毒毒素中毒有明显区别。重复试验可获得一致的试验结果。

表2 生孢梭菌和肉毒梭菌培养液对ICR小鼠中毒症状及死亡结果对比

Table 2 Poisoning symptoms of mice tested in the toxic effect of the culture supernatant produced by *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum*

比较项目	生孢梭菌培养物腹腔注射给予小鼠	肉毒梭菌培养物阳性对照
死亡时间	10 min内死亡,多数平均5~7 min	24 h内死亡,平均2~6 h
中毒表现	竖毛、不活动、呼吸困难、肢无力、皮肤发紫、猝死	竖毛、四肢瘫痪、呼吸呈风箱式、腰部凹陷(蜂腰)、死于呼吸麻痹
培养液加热处理	10 min内死亡,平均多数5~7 min	不出现中毒症状和死亡
培养液胰酶处理	10 min内死亡,平均多数5~7 min	部分毒性可增强
A-F多价抗肉毒毒素诊断血清	小鼠死亡,A-F多价抗肉毒毒素诊断血清无保护作用	动物不死亡,A-F多价抗肉毒毒素诊断血清有保护作用
死亡动物皮肤及内脏肉眼观察	注射后皮肤发紫,解剖见内脏颜色暗紫、无溶血;但注射液与血液作用10 min可见红细胞皱缩、破裂、细胞碎片及红细胞凝集等	无异常

### 3 讨论

生孢梭菌属于亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌(*Sulfite-reducing clostridia*, SRC),为一群厌氧、过氧化氢酶阴性、能将亚硫酸盐还原为硫化物的革兰氏阳性梭状芽胞杆菌,其孢子广泛分布于自然界,通常存在于人和动物的粪便、废水和土壤中,代表性菌种除了生孢梭菌外,还包括致黑梭状芽胞杆菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌等。因此,生孢梭菌通常

以SRC的形式作为评估食品、食品加工设备及食品生产环境等微生物污染指示菌,不认为其有致病性<sup>[6-7]</sup>。

SRC孢子对物理和化学因子抵抗力较强,因此在水体微生物检测中常被作为受动物排泄物污染和过程控制指标。SRC最初被作为致病性梭状芽胞杆菌污染的指标菌提出来,目的是判断食品,尤其是罐头食品和婴幼儿配方食品是否被不同来源的梭状芽胞杆菌(如粪便来源的产气荚膜梭菌和土壤来源的肉毒梭菌)污染。由于此类细菌芽胞抵抗力强,可在加工不当的食品中存活,适宜条件下又可生长繁殖而造成食品品质降低或腐败,甚至引起食物中毒,因此目前越来越多地将SRC用于指示食品被粪便污染、加工环境卫生状况控制、食品生产过程控制指标,以监测产芽孢厌氧菌的潜在生长和存活力<sup>[7]</sup>。

但到目前为止,绝大多数国家和国际组织未将SRC作为常规检测项目列入乳与乳制品的安全控制。根据已有资料<sup>[8-9]</sup>,在乳制品中设置SRC强制性限量标准的国家仅有俄罗斯和阿尔及利亚。美国乳品出口协会提出10~25 cfu/g<sup>[7]</sup>的建议限量值。

尽管目前尚未见报道称生孢梭菌可引起婴幼儿和成人的食物中毒,但2010年Barash等<sup>[10]</sup>从9份市售的婴幼儿配方粉中的7份检测到梭菌的孢子,经鉴定主要为生孢梭菌。针对此次国际食品安全当局网络通报的“新西兰乳制品企业在浓缩乳清蛋白粉中检出肉毒梭菌”的情况,2013年8月23日,国际食品微生物标准委员会与国际微生物学联合会就婴幼儿配方粉和婴幼儿配方粉用基粉中检测肉毒梭菌的科学性进行评估时,提出不建议将肉毒梭菌列入婴幼儿配方粉和婴幼儿配方粉用基粉的常规检测项目,但当产品存在受肉毒梭菌孢子污染的风险时,可检测SRC。鉴于SRC污染水平可用于判断浓缩乳制品或产品(如婴幼儿配方粉)生产过程是否遵循良好卫生和生产操作。如果SRC超过100 cfu/g,说明生产条件可能有利于厌氧微生物的繁殖,或指示有外源性污染,应对可能存在的污染原因进行调查并采取必要的措施降低污染<sup>[7]</sup>。

通常认为生孢梭菌不具有致病性,但有研究报道,从出血性腹泻的兔中分离到一株可产生出血毒素的生孢梭菌,提纯的毒素可以水解III型和IV型胶原,也能水解由I型、II型、III型和IV型胶原生产的明胶。表明生孢梭菌产生的毒素具有胶原酶的活性,可以水解III型和IV型胶原,而III型和IV型胶原是血管壁内膜的组成成分,从而破坏血管壁的

结构,引起出血,进一步的研究表明<sup>[1-3]</sup>该毒素直接作用在兔肠道血管壁的内皮细胞,但对小鼠、大鼠和豚鼠则不显示毒性作用。

本研究初步结果显示,分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品中的生孢梭菌,其代谢产物显示出对 ICR 小鼠致死的毒性作用,死亡时间多在 10 min 内,平均 5~7 min。且含毒素的培养液加热处理后仍保留毒性,且 A-F 多价抗肉毒毒素诊断血清对小鼠的死亡无保护作用,说明分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品的生孢梭菌其代谢产物含有不同于肉毒毒素的有毒代谢产物。腹腔注射后中毒死亡的小鼠经解剖肉眼见小鼠内脏颜色暗紫,培养液与小鼠血液作用 10 min 后,显微镜下可见红细胞皱缩、破裂、细胞碎片及红细胞凝集等现象。

本文对初步探讨了生孢梭菌毒性代谢产物对 ICR 小鼠的毒性作用,尚需进一步深入研究生孢梭菌是否对人,尤其是对婴幼儿的健康危害作用,需要开展我国乳制品食品中,尤其是婴幼儿配方食品中包括生孢梭菌在内的 SRC 监测,以便更好地开展生孢梭菌风险评估工作。

## 参考文献

[1] Hara-Kudo Y, Yamakawa Y, Kumagai S. Purification and some

properties of *Clostridium sporogenes* hemorrhagic toxin [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 1996, 227(2):413-418.

[2] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop [J]. *Microb Pathog*, 1997, 22(1):31-38.

[3] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* in various animals and cultured cells [J]. *J Med Microbiol*, 1997, 46(4):270-275.

[4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 12—2003 食品卫生微生物检验方法肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.

[5] FDA. Bacteriological analytical manual: Chapter 17 *Clostridium botulinum* [S]. 2010.

[6] 熊海元, 崔强. 生孢梭菌孢子作为生物指示剂的研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(7):354-356.

[7] Usefulness of testing for *Clostridium botulinum* in powdered infant formula and dairy-based ingredients for infant formula [S]. International Commission on Microbiological Specifications for foods, International Union of Microbiological Society, 2013-08-27.

[8] Appendix 1, Microbiological criteria relative to some food products [Z]. Official Journal of the Republic of Algeria, 1998(35).

[9] 婴儿配方奶粉和婴儿配方用乳制品成分中肉毒梭菌检测的有用性[R]. 国际微生物学会联合会报告, 2013.

[10] Barash J R, Hsia J K, Arnon S S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas [J]. *J Pediatr*, 2010, 156(3):402-408.

## 论著

### 3 种不同方法提取芒果致敏原组分分析

侯丽英<sup>1</sup>, 张盈莹<sup>1</sup>, 朱黎娜<sup>1</sup>, 谷冬梅<sup>2</sup>, 林书祥<sup>3</sup>, 李会强<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 3. 天津市儿童医院, 天津 300204)

**摘要:**目的 评价 3 种芒果致敏原提取方法, 分析与血清特异性 IgE 结合的芒果蛋白成分, 为临床检测 sIgE 提供最佳抗原制备方法。方法 分别用三氯乙酸沉淀法、三氯乙酸/丙酮沉淀法、裂解液提取法粗提芒果蛋白, 并通过 SDS-PAGE 和二维电泳技术分析不同提取方法提取的芒果蛋白组分, 用免疫印迹和二维免疫印迹的方法鉴定粗提液中与患者特异性 IgE 结合的蛋白成分。结果 3 种方法提取的蛋白组分不同, 单例病人血清与 3 种不同方法提取的蛋白结合的强度和所识别的蛋白组分存在一定差异, 三氯乙酸沉淀法和三氯乙酸/丙酮法提取的蛋白反应条带主要是 30、40、44、47 和 90 kD, 而裂解液提取的蛋白反应条带主要是 23、32、40、46、73、90 kD。结论 3 种提取方法各有特点, 三氯乙酸沉淀法提取的芒果蛋白粗提液致敏原组分较完整, 重复性好, 操作简便, 能够满足检测芒果 sIgE 所需已知抗原的要求。

**关键词:**食物; 致敏; 芒果; 特异性 IgE; 致敏原制备; 免疫印迹

中图分类号: R155; S667. 7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0417-05

DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2014. 05. 003

收稿日期: 2014-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371882)

作者简介: 侯丽英 女 硕士生 研究方向为食物过敏原鉴别与应用研究 E-mail: wfhy19901108@163.com

通讯作者: 李会强 男 教授 研究方向为标记免疫分析方法学研究及致敏性疾病的实验室诊断 E-mail: lihuiqiang1965@163.com