

降解黄曲霉毒素 B₁ 芽孢杆菌的 分离鉴定及其特性研究

刘蓓^{1,2}, 董雯雯^{1*}, 肖雅清^{1,2}, 袁小远¹, 李桂明¹, 刘明超², 孟凯¹

(1. 山东省农业科学院家禽研究所, 山东 济南 250100; 2. 河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071000)

摘要:本研究旨在从不同来源的样本中分离出对黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 具有降解作用的芽孢杆菌, 为降解 AFB₁ 的芽孢杆菌开发利用提供理论依据。采集鸡的肠道、肛拭子和土壤样本, 富集后利用 MYP 固体培养基和初筛培养基筛选出疑似芽孢杆菌的菌落, 通过分析细菌对 AFB₁ 的降解率复筛, 选出对 AFB₁ 具有降解作用的菌株, 通过 16S rRNA 测序鉴定细菌种属, 然后对筛选出的芽孢杆菌的溶血性、抗生素敏感性、生长曲线、耐酸和耐胆盐性进行测试。结果显示, 共筛选出 20 株对 AFB₁ 具有降解作用的芽孢杆菌。结合细菌测序和溶血试验结果, 选择 3 株降解率高的地衣芽孢杆菌 (S51、S48、S8-2) 进行试验, 结果表明, 3 株芽孢杆菌对多种抗生素较敏感, 其中 S51 的生长速度最快, 菌液浓度最大, 对酸和胆盐的耐受性均强于另外两株菌。本研究筛选出 1 株对 AFB₁ 有较好降解作用的地衣芽孢杆菌, 具有良好的安全性和耐受性, 有望作为微生态制剂应用到 AFB₁ 降解过程中。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 降解; 芽孢杆菌

中图分类号:S476.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-4942(2024)12-0105-08

Isolation and Identification of *Bacillus* Degrading Aflatoxin B₁ and Its Characterization

Liu Bei^{1,2}, Dong Wenwen^{1*}, Xiao Yaqing^{1,2}, Yuan Xiaoyuan¹,
Li Guiming¹, Liu Mingchao², Meng Kai¹

(1. Poultry Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

2. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract The aim was to isolate *Bacillus* sp. with degrading effect on aflatoxin B₁ (AFB₁) from samples of different sources, so as to provide a theoretical basis for the exploitation and utilization of *Bacillus* strains degrading AFB₁. The intestinal contents and anal swabs of chickens and soil samples were collected. After enrichment, the suspected *Bacillus* colonies were selected through culture using MYP and primary screening medium, and then the strains with degrading effect on AFB₁ were selected by analyzing the degradation rate of

收稿日期:2023-11-23

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2021MC060);河北农业大学引进人才科研专项(ZD201723);山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2023A10, CXGC2023A22);山东省重点研发计划项目(2022LZGC014);泰山产业领军人才工程专项(tscx202306046);山东省农业良种工程课题(2022LZGC013)

作者简介:刘蓓(1998—),女,河北三河人,硕士研究生,研究方向为兽医学。E-mail:l133401@163.com

董雯雯(1990—),女,山东德州人,硕士,助理研究员,主要从事家禽疫病防控及功能性植物提取物研究。E-mail:dongwenwen-jqs@163.com

*同为第一作者。

通信作者:刘明超(1987—),男,博士,副教授,主要从事兽医临床诊疗、兽医内科学、动物营养与免疫等领域的教学研究。E-mail:liumingchao@163.com

孟凯(1988—),男,博士,副研究员,主要从事家禽疫病防治研究。E-mail:mengkai1215@163.com

AFB₁ and identified the bacterial genus and species by 16S rRNA sequencing. The selected *Bacillus* strains were tested for hemolysis, antibiotic sensitivity, growth curve, acid and bile salt resistance. The results showed that a total of 20 *Bacillus* strains degrading AFB₁ were selected. Combined with the results of bacterial sequencing and hemolysis test, three *B. licheniformis* strains (S51, S48, S8-2) with high degradation rate were selected for further tests. The results showed that the three *B. licheniformis* strains were sensitive to multiple antibiotics; among which, S51 had the highest growth rate, the largest concentration of bacterial fluid, and was more tolerant to both acid and bile salt than the other two strains. Overall, one *B. licheniformis* strain with better degrading effect on AFB₁ was selected for its good safety and tolerance, which was expected to be applied as a microecological agent in the degradation process of AFB₁.

Keywords Aflatoxin B₁; Degradation; *Bacillus*

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AF) 是由多种黄曲霉和寄生曲霉通过聚酮途径产生的二呋喃香豆素衍生物, 目前已经分离鉴定出的 AF 有 20 多种, 其中以 AFB₁ 分布最广、毒性最强^[1-2]。AFB₁ 的代谢物具有急性毒性、致畸性、致突变性和致癌性^[3]。动物食入 AFB₁ 后, 毒素会在体内蓄积造成急性或慢性中毒, 影响动物的生长性能, 损伤生殖系统、消化系统、免疫系统等, 降低养殖户的经济效益^[4]。AF 还存在于中毒动物的肉蛋奶中, 严重威胁食品安全^[5]。近几年, 随着畜禽饲养数量的不断增加, 饲料消耗量也随之增多, 饲料在存储运输过程中极易发生发霉变质等情况。

目前 AF 的解毒方法有三种: 物理降解、化学降解、微生物降解^[6]。其中微生物是通过将霉菌毒素结合到其表面降解或转化为毒性较小的代谢物来起作用, 相较于物理和化学方法, 具有安全、高效、绿色且对动物存在益生作用等优点^[7]。芽孢杆菌因具有稳定的结构、良好的抗逆性以及具有调节免疫、增强机体对疾病的抵抗力等益生作用, 在动物养殖过程中被广泛应用^[8-9]。Liu 等^[10]给 1 日龄肉鸡连续灌服凝结芽孢杆菌 42 天, 发现其可以通过改善肠道菌群、促进肉鸡肠上皮细胞再生和增强先天免疫力来保护肠黏膜屏障; Jia 等^[11]研究发现, 给食用黄曲霉毒素污染饲料的蛋鸡连续饲喂枯草杆菌降解产物 4 周, 可以明显改善蛋鸡的采食量、产蛋量等生产性能; Li 等^[12]研究发现, 给小鼠灌服解淀粉芽孢杆菌 28 天能够缓解 AFB₁ 对小鼠肝脏的损伤。基于以上研究, 本试验旨在从不同来源的样品中分离具有良好安全性和耐受性的 AFB₁ 降解菌, 以期作为芽孢

杆菌降解 AFB₁ 的研究和微生物解毒制剂的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源 从济南市某市场采集不同日龄健康鸡的盲肠内容物和肛拭子样本共 20 份; 从济南华山湖采集土壤样品 10 份。

1.1.2 主要试剂 初筛培养基: (NH₄)₂SO₄ 5.0 g, KH₂PO₄ 2.5 g, MgSO₄ 1.0 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.5 g, CaCl₂ 0.1 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 7, 121 °C 灭菌 15 min, 加入过滤除菌的香豆素溶液至 1 g/L。LB 培养基、MYP 培养基和 MH 琼脂培养基, 购自青岛海博生物技术有限公司。血平板培养基, 购自环凯微生物科技有限公司。AFB₁ 标准品, 购自 FERMENTEK。AFB₁ ELISA 试剂盒, 购自南京博研生物技术有限公司。DNA 提取试剂盒, 购自北京天根生化科技有限公司。庆大霉素、青霉素及四环素等 12 种药敏纸片, 购自杭州微生物试剂有限公司。香豆素, 购自 Macklin。猪胆盐, 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 降解菌株的筛选

1.2.1 初筛 将采集到的肠道和土壤样本置于 50 mL 的 LB 液体培养基中富集培养 24 h, 将富集后的菌液用无菌水梯度稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶, 划线培养于 MYP 固体培养基, 37 °C 倒置培养 24 h, 重复操作 2 次。纯化后的细菌染色后进行形态特征观察, 选取疑似芽孢杆菌的菌株继续划线培养于含有香豆素的初筛培养基, 选择在初筛培养基上生长良好的细菌菌液与 60% 的甘油 1:1 混合, -80 °C 冻存。

1.2.2 复筛 挑取单个菌落接种在 5 mL LB 液体培养基,37 ℃、180 r/min 培养 24 h。将菌液按照 5%的比例接种在 50 mL LB 液体培养基中进行发酵,37 ℃、160 r/min 培养 48 h。培养结束后,取 980 μL 发酵液与 20 μL AFB₁ 标准品 (5 μg/mL) 混合,使 AFB₁ 的最终浓度为 100 ng/mL,37 ℃、150 r/min 避光孵育 72 h。以不接种菌液的 LB 培养基加入 20 μL 的 AFB₁ 标准品作为空白对照。孵育结束,4 000 r/min 低温离心 5 min,吸取上清液,使用 AFB₁ ELISA 试剂盒检测菌液上清中 AFB₁ 的含量。每个菌株重复 3 次。AFB₁ 降解率 (%) = (对照组 AFB₁ 含量 - 细菌组 AFB₁ 含量) / 对照组 AFB₁ 含量 × 100。

1.3 菌株 16S rRNA 基因序列鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的基因组 DNA,采用细菌 16S rRNA 通用引物 (27F/1492R) 对分离菌株的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μL): DNA 模版 1 μL,引物 27F、1492R 各 0.4 μL,2 × Taq PCR StarMix 10 μL, ddH₂O 8.2 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,25 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证后,送往深圳华大基因股份有限公司测序,测序结果输入 BLAST 进行序列比对。

1.4 菌株特性分析

1.4.1 溶血试验 挑取单菌落,接种于 5 mL LB 液体培养基,37 ℃、170 r/min 过夜培养。将菌液划线于血平板上,37 ℃ 倒置培养 24 h,观察菌落周围是否出现溶血环。

1.4.2 药敏试验 首先在 LB 平板上挑取芽孢杆菌,接种于 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养过夜,用无菌水调整为麦氏浊度为 0.5 的菌悬液。用无菌棉棒蘸取菌悬液,均匀涂布于 MH 琼脂平板,室温放置 5 min。用无菌镊子将药敏纸片贴在涂布有菌液的 MH 琼脂平板上并做好标记,37 ℃ 培养 24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径,根据抗生素敏感性评价标准 (表 1) 判定结果。

1.4.3 细菌生长曲线 将细菌按照 5% 接种量接种于 LB 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 72 h,每 12 h 用酶标仪检测菌液在波长 630 nm 处的吸光度,以培养时间为横坐标,吸光度为纵坐

标,绘制细菌生长曲线。

表 1 抗生素敏感性评价标准

抗生素	剂量	抑菌圈直径/mm		
		耐药 (R)	中度敏感 (I)	敏感 (S)
青霉素 G	10 U	≤26	27~28	≥29
苯唑西林	1 μg	≤10	>10~<13	≥13
庆大霉素	10 μg	≤12	>12~<15	≥15
四环素	30 μg	≤14	>14~<19	≥19
多西环素	30 μg	≤12	>12~<16	≥16
阿奇霉素	15 μg	≤13	>13~<18	≥18
万古霉素	30 μg	—	—	≥15
克林霉素	2 μg	≤15	>15~<19	≥19
甲氧苄啶	5 μg	≤10	>10~<16	≥16
利福平	5 μg	≤16	>16~<20	≥20
氯霉素	30 μg	≤12	>12~<18	≥18
环丙沙星	5 μg	≤15	>15~<21	≥21

1.4.4 细菌耐受性试验 耐酸试验:将 0.5 mL 分离菌悬液分别接种于 pH 值为 1.0、2.0、3.0、4.0 的 4.5 mL 无菌 LB 液体培养基中,37 ℃ 处理 3 h。以酸处理 0 h 的 LB 培养基作为对照。取 100 μL 菌液 10 倍稀释后,选 3 个稀释度平板计数。37 ℃ 恒温培养 24 h 后计数活菌数量,按照公式计算存活率。存活率 (%) = 酸处理 3 h 的活菌数 (cfu/mL) / 酸处理 0 h 的活菌数 (cfu/mL) × 100。

耐胆盐试验:挑取单菌落接种于 LB 液体培养基并置于摇床中 37 ℃、180 r/min 过夜培养。将 0.5 mL 菌悬液分别接种于 4.5 mL 含 0.1%、0.2%、0.3% 胆盐的 LB 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 3 h。以胆盐处理 0 h 的 LB 液体培养基为对照。取菌液适度稀释,进行平板计数,计算存活率。存活率 (%) = 胆盐处理 3 h 的活菌数 (cfu/mL) / 胆盐处理 0 h 的活菌数 (cfu/mL) × 100。

1.5 S51 菌株降解特性

取 10 mL 菌株 S51 发酵液,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,分离获得上清液和菌体。菌体用无菌蒸馏水洗涤、离心,重复 3 次后加入 10 mL 无菌蒸馏水制备成 S51 菌悬液。按上述方法制备 10 mL 菌悬液,随后低温超声破碎 20 min,无菌过滤制备胞内液。将 S51 上清液、菌悬液、胞内液分别加入 AFB₁,37 ℃ 孵育 72 h 后,检测各组 AFB₁ 降解率。

1.6 数据处理与分析

试验数据用 Microsoft Excel 汇总后进行初步

整理,利用 GraphPad Prism 6.02 进行 One-way ANOVA 分析和作图。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的筛选

2.1.1 初筛 利用 MYP 培养基共分离出 73 株细

菌,通过形态特征观察,筛选出菌落呈乳白色、边缘不规则、显微镜下菌体呈蓝紫色杆状的革兰氏阳性菌(图 1),初步判断有 27 株为芽孢杆菌。因香豆素的化学结构与 AFB₁相似,继续筛选在含有香豆素的初筛培养基上生长良好的细菌,选出 20 株可能对 AFB₁具有降解作用的细菌。

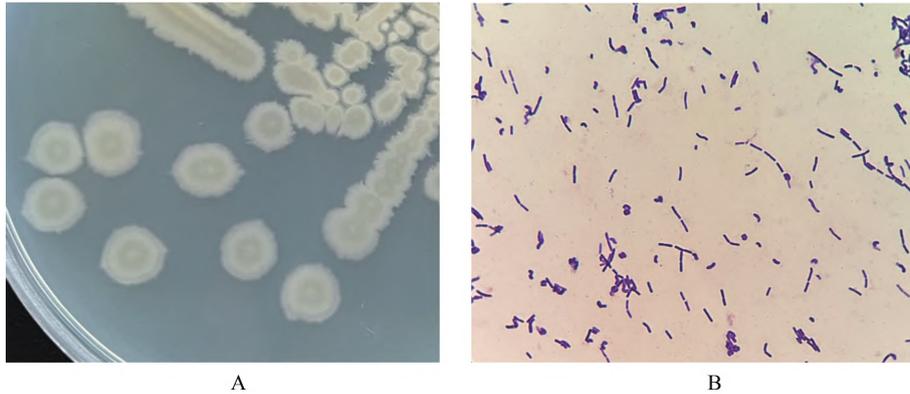


图 1 部分芽孢杆菌菌落形态(A)及革兰氏染色镜检图(1 000×)(B)。

2.1.2 复筛 将筛选的菌株与 AFB₁共培养,检测细菌对 AFB₁的降解率。结果(图 2)显示,降解率在 50% 以上的有 4 株,分别为菌株 S51、S48、S8-2、S45,对 AFB₁的降解率分别为 61.03%、58.80%、53.18%、52.58%。

芽孢杆菌各 1 株(表 2)。

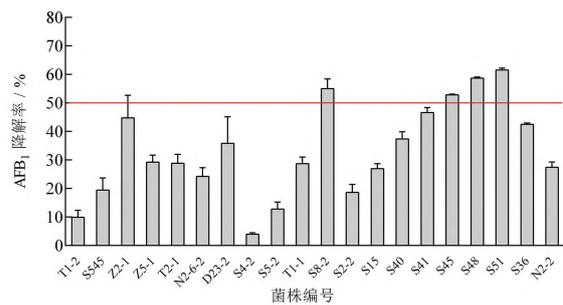


图 2 AFB₁降解菌株复筛结果

2.2 菌株 16S rRNA 基因序列鉴定

经 BLAST 比对,这 20 株菌均为芽孢杆菌,其中地衣芽孢杆菌有 10 株,枯草芽孢杆菌有 2 株,蜡样芽孢杆菌有 3 株,贝莱斯芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、假真菌样

表 2 16S rRNA 测序结果

菌株编号	来源	参考菌株	相似性/%	GenBank 登录号
D23-2	鸡盲肠	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> SRCM125727	100.00	CP116773.1
T1-1	土壤	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> ARCHA-01	99.40	MH507250.1
T1-2	土壤	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> BPR1	99.93	MF000303.1
T2-1	土壤	蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus mycoides</i> LZH-X41	99.79	KY049894.1
N2-6-2	土壤	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i> AN4	100.00	OQ566219.1
N2-2	土壤	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> NRS6160	99.49	OX419554.1
Z2-1	土壤	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> BXC19	100.00	MN227494.1
Z5-1	土壤	假真菌样芽孢杆菌 <i>Bacillus pseudomycolides</i> AB-CSL9	99.93	MG780243.1

表 2(续)

菌株编号	来源	参考菌株	相似性/%	GenBank 登录号
S2-2	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> NB45	100.00	MT534569.1
S4-2	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> CICC10181	100.00	AY842871.1
S5-2	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> YW01-12	100.00	MT368012.1
S8-2	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> K3	99.93	KU922431.1
S545	鸡肱拭子	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> DE-7	99.93	MT240918.1
S15	鸡肱拭子	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> BC-2	100.00	KF835391.1
S36	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> R-QL-77-10	100.00	MT078630.1
S40	鸡肱拭子	副地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus paralicheniformis</i> NYGR20	98.97	MN922812.1
S41	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> MPF38	99.86	MT487681.1
S45	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> QT201	100.00	MT072145.1
S48	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> NB45	99.86	MT534569.1
S51	鸡肱拭子	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> QT338	100.00	MT043735.1

2.3 菌株特性

2.3.1 菌株溶血性 如图 3 所示,20 株芽孢杆菌中,T1-1、D23-2、N2-6-2、D23-2 和 Z5-1 的菌落周围存在溶血环,有溶血现象。结合细菌的形

态特征、对 AFB₁ 的降解率、16S rRNA 基因序列分析以及溶血试验结果,最终选择 S51、S48 和 S8-2 这 3 株地衣芽孢杆菌进行后续试验。



图 3 菌株的溶血性

2.3.2 菌株药敏试验 由表 3 可知,3 株地衣芽孢杆菌均对庆大霉素、多西环素、万古霉素和环丙沙星敏感,对青霉素 G、阿奇霉素和克林霉素耐药,对利福平中度敏感。其中菌株 S48 对 8 种药物敏感,对 1 种药物中度敏感;菌株 S51 对 5 种药物敏感,对 4 种药物中度敏感;菌株 S8-2 对 4 种药物敏感,对 5 种药物中度敏感。

2.3.3 菌株生长曲线 由图 4 可知,S51、S48、S8-2 这 3 株地衣芽孢杆菌均在培养 24 h 达到生长稳定期,其中菌株 S51 生长速度最快;在前 12 h

菌株 S48 的生长速度高于 S8-2;在 24 h 之后菌株 S8-2 的生长速度高于 S48。持续监测 72 h,3 株地衣芽孢杆菌的浓度均能维持在稳定水平。

2.3.4 细菌耐受性 3 株芽孢杆菌对不同酸度的耐受性见图 5。3 株芽孢杆菌的存活率随着 pH 值的升高而提升,其中 S51 菌株对不同酸性溶液的耐受性明显高于另外两株芽孢杆菌,其在 pH 值 1.0 条件下的存活率为 26.06%,在 pH 值 4.0 条件下的存活率为 64.12%。

表 3 3 株地衣芽孢杆菌药敏试验结果

药物	药物含量	敏感性		
		S48	S51	S8-2
青霉素 G	10 U	R	R	R
苯唑西林	1 μg	S	I	I
庆大霉素	10 μg	S	S	S
四环素	30 μg	S	I	I
多西环素	30 μg	S	S	S
阿奇霉素	15 μg	R	R	R
万古霉素	30 μg	S	S	S
克林霉素	2 μg	R	R	R
甲氧苄啶	5 μg	S	S	I
利福平	5 μg	I	I	I
氯霉素	30 μg	S	I	I
环丙沙星	5 μg	S	S	S

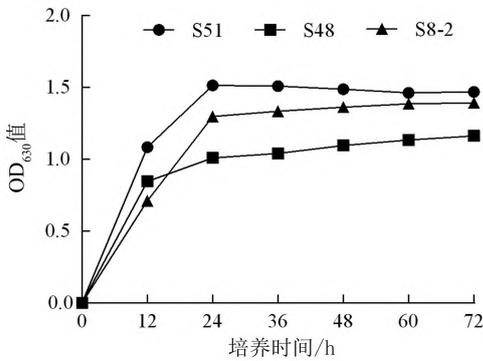


图 4 3 株地衣芽孢杆菌的生长曲线

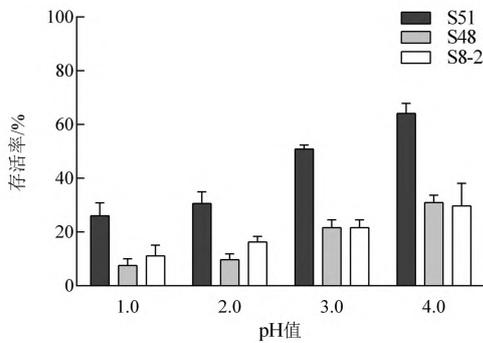


图 5 3 株地衣芽孢杆菌在不同 pH 值条件下的存活率

3 株芽孢杆菌对不同浓度胆盐溶液的耐受性见图 6。胆盐对 3 株芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用,并随着胆盐终浓度的升高细菌的存活率降低。S48 对胆盐的耐受性最低,在 0.1%和 0.3%的胆盐浓度下存活率分别为 32.05%和 22.26%。在 0.1%的胆盐浓度下 S51 的耐受性最高,为 51.54%;在 0.2%的胆盐浓度下 S8-2 的耐受性较高,为 46.22%。

2.4 S51 菌株降解特性

比较菌株 S51 上清液、菌悬液、胞内液对

AFB₁ 的降解特性,发现上清液的降解能力最强,达 61.03%,菌悬液和胞内液的降解效果相对较弱,降解率分别为 10.17%和 7.15%(图 7)。表明菌株 S51 对 AFB₁ 的脱毒能力主要来源于上清液中的某种活性物质,而非吸附作用。

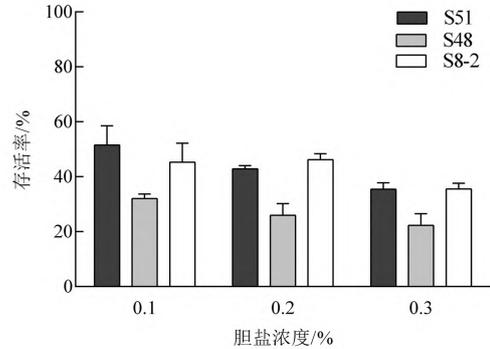


图 6 3 株地衣芽孢杆菌在不同胆盐浓度下的存活率

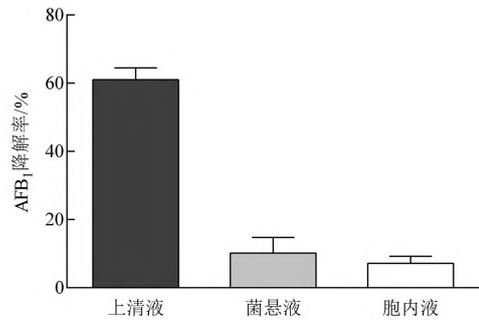


图 7 菌株 S51 各组分对 AFB₁ 的降解率

3 讨论与结论

动物饲料大量堆积容易出现发霉变质现象,如何对饲料中的黄曲霉毒素进行解毒成为问题关键。利用微生物降解黄曲霉毒素是近些年研究较多的一种解毒方法,目前已发现的降解菌有芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌、假单胞菌和黑曲霉等^[13]。芽孢杆菌可以分泌多种酶类和蛋白,通过降解和吸附的方式将 AFB₁ 转化为低毒的或无毒的化合物达到解毒效果。本研究采集土壤以及鸡的肠道和肛拭子样本,经过富集、MYP 培养基培养、革兰氏染色镜检以及含香豆素的培养基培养对分离菌进行初筛,选出 20 株可能对 AFB₁ 具有降解作用的细菌,经与 AFB₁ 共培养复筛发现 4 株芽孢杆菌(S51、S48、S8-2、S45)对 AFB₁ 的降解率在 50%以上,通过 16S rRNA 测序鉴定均为地衣芽孢杆菌。王康^[14]从发霉的谷物中分离出 2 株枯草芽孢杆菌,对 AFB₁ 的降解率分别为 70.65%和

61.42%。细菌对 AFB₁ 的降解率与 AFB₁ 浓度、反应时间、反应温度等条件有关^[15]。Wang 等^[16] 从土壤中分离出 1 株地衣芽孢杆菌,120 h 内对 AFB₁ 的降解率为 89.1%。程思忠等^[17] 分离出一株能够降解 AFB₁ 的贝莱斯芽孢杆菌,发现其主要通过上清液中的胞外酶发挥解毒作用。王明清等^[18] 筛选出一株 AFB₁ 降解菌,其各组分中上清液的降解率最高可达 91.7%。本试验进一步研究表明菌株 S51 降解 AFB₁ 的活性组分主要存在于胞外上清液中,该结果可为后续分析 S51 菌株降解 AFB₁ 的活性物质奠定基础。

安全性试验是评价细菌能否应用到动物体内的关键。细菌的溶血性是筛选菌株的先决条件,溶血阳性细菌通常被认为存在安全风险,会对宿主的健康产生威胁^[19]。通过溶血试验对筛选出的 20 株芽孢杆菌进行安全性评价,其中 T1-1、D23-2、N2-6-2、D23-2 和 Z5-1 这 5 株细菌菌落周围出现透明的溶血环,表明存在溶血现象。结合细菌的复筛结果和菌种测序结果,最终选取 3 株菌进行后续试验,分别是 S51、S48、S8-2。益生菌对抗生素的敏感性也是评价细菌安全性的重要指标之一^[20]。细菌对抗生素的耐药性既可以是特定物种所固有的,也可以通过基因突变或水平基因转移获得^[21]。携带耐药基因较少的菌株进入动物体内,其耐药基因转移的风险也会随之减少^[22]。药敏试验结果显示 3 株菌均对庆大霉素、多西环素、万古霉素和环丙沙星敏感,对青霉素 G、阿奇霉素和克林霉素耐药,对利福平中度敏感。这与地衣芽孢杆菌对克林霉素的耐药性是固有特性且与其耐药基因有关的报道相一致^[23]。

对 S51、S48、S8-2 这 3 株地衣芽孢杆菌生长性能的监测结果显示,在 24 h 内均能达到生长稳定期,其中 S51 菌株生长最快,细菌浓度最大;连续培养 72 h, S51 的细菌数量略有下降,菌株 S48 和 S8-2 的细菌数量略有升高,但 3 株细菌的数量均能够维持在稳定水平,暗示芽孢杆菌进入动物体内后可以持续发挥降解作用。

能够在胃和小肠的恶劣环境中生存是益生菌所需的特性之一^[24]。益生菌进入机体后,首先会在胃内停留 3 h,动物胃肠道的 pH 值为 1.5~4.0,经过胃酸的消化后益生菌进入小肠,由胆盐形成的高渗透环境会改变细胞外膜的通透性从而起到

杀菌作用,胆盐浓度为 0.03%~0.30%^[25]。对酸和胆盐的耐受能力直接影响益生菌能否在动物体内存活。通过对 3 株地衣芽孢杆菌进行耐受性试验发现,即使 pH 值为 1.0 的强酸情况下,3 株菌仍能保持一定的活性,其中菌株 S51 的存活率能达到 20%以上,在 pH 值 4.0 的情况下 S51 的存活率可以达到 60%以上,表明其对酸的耐受性较强,能够通过胃酸消化。这与张昊等^[26] 的研究结果一致。耐胆盐的试验结果显示,芽孢杆菌 S51 对胆盐的耐受性最强,在 0.1% 的胆盐浓度下存活率可达 50%以上。这些结果表明地衣芽孢杆菌 S51 对酸和胆盐的耐受性强于另外 2 株菌,有作为益生菌添加剂的潜力。

本研究从土壤及鸡的肠道和肛拭子样本中分离出 20 株对 AFB₁ 具有降解作用的芽孢杆菌,其中有 4 株地衣芽孢杆菌对 AFB₁ 的降解率在 50%以上。从中筛选出一株对 AFB₁ 降解率较高的地衣芽孢杆菌 S51,其具有良好的生长性能,无溶血现象,耐酸、耐胆盐,耐药性较差,有望作为微生物添加剂用于降低饲料中 AFB₁ 的含量。后续仍需开展动物体内试验检测 S51 在动物体内的安全性和解毒效果。

参 考 文 献:

- [1] Ajmal M, Bedale W, Akram A, et al. Comprehensive review of aflatoxin contamination, impact on health and food security, and management strategies in Pakistan[J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(12):845.
- [2] Bennett J W, Klich M. Mycotoxins[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16(3):497-516.
- [3] Cao W Y, Yu P, Yang K P, et al. Aflatoxin B₁: metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2022, 32(6):395-419.
- [4] Fouad A M, Ruan D, El-Senousey H K, et al. Harmful effects and control strategies of aflatoxin B₁ produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: review[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(3):176.
- [5] Guan Y, Chen J, Nepovimova E, et al. Aflatoxin detoxification using microorganisms and enzymes[J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(1):46.
- [6] Wang L L, Huang Q, Wu J, et al. The metabolism and biotransformation of AFB₁: key enzymes and pathways[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2022, 199:115005.
- [7] 王文欣. 微生物降解饲料中黄曲霉毒素的研究进展[J]. 饲

- 料研究,2021,44(9):153-155.
- [8] Al-Khalaifa H, Al-Nasser A, Al-Surayee T, et al. Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2019, 98(10):4465-4479.
- [9] Balta I, Butucek E, Stef L, et al. Anti-*Campylobacter* probiotics; latest mechanistic insights[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2022, 19(10):693-703.
- [10] Liu C R, Radebe S M, Zhang H, et al. Effect of *Bacillus coagulans* on maintaining the integrity intestinal mucosal barrier in broilers[J]. Veterinary Microbiology, 2022, 266(5):109357.
- [11] Jia R, Ma Q G, Fan Y, et al. The toxic effects of combined aflatoxins and zearalenone in naturally contaminated diets on laying performance, egg quality and mycotoxins residues in eggs of layers and the protective effect of *Bacillus subtilis* biodegradation product [J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 90:142-150.
- [12] Li X T, Lv Z M, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B₁ [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 151:112124.
- [13] 李智高, 毛永杨, 狄朋敏, 等. 食品中黄曲霉毒素的降解方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14):4597-4602.
- [14] 王康. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及培养条件优化[D]. 长春: 长春理工大学, 2020.
- [15] 张瑾, 余祖华, 丁轲, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及生物学特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14):175-180.
- [16] Wang Y, Zhang H Y, Yan H, et al. Effective biodegradation of aflatoxin B₁ using the *Bacillus licheniformis* (BL010) strain [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(12):497.
- [17] 程思忠, 谢岩黎, 孙淑敏, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选鉴定及降解酶挖掘[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(4):1-7.
- [18] 王明清, 张初署, 于丽娜, 等. 降解黄曲霉毒素 B₁ 芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 山东农业科学, 2018, 50(11):71-75.
- [19] Huang X D, Ai F, Ji C, et al. A rapid screening method of candidate probiotics for inflammatory bowel diseases and the anti-inflammatory effect of the selected strain *Bacillus smithii* XY1 [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:760385.
- [20] 孙艳, 冯晓微, 刘佳玮, 等. 健康奶牛生殖道乳酸菌的分离鉴定及其抑菌活性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(5):1852-1859.
- [21] Agersø Y, Bjerre K, Brockmann E, et al. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome[J]. PLoS ONE, 2019, 14(1):e0210363.
- [22] 贾丹. 猪源益生菌的益生潜能评价[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2020.
- [23] 董文豪, 宫晓炜, 郑福英, 等. 猪源地衣芽孢杆菌的分离筛选及其特性[J]. 甘肃农业大学学报, 2021, 56(5):8-17.
- [24] Prieto M L, O'Sullivan L, Tan S P, et al. *In vitro* assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics [J]. Marine Drugs, 2014, 12(5):2422-2445.
- [25] 李琼燕. 枯草芽孢杆菌的分离鉴定及对沙门氏菌的保护性实验研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [26] 张昊, 孙愉, 李畅洋, 等. 牛源地衣芽孢杆菌的分离培养及生物学特性分析[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(7):281-286.