

## 植物乳杆菌 BS22 对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的吸附效果 及对肉鸡消化道菌群的影响

张艳<sup>1,2</sup>, 曾东<sup>1,2</sup>, 倪学勤<sup>1,2\*</sup>, 王剑<sup>1,2</sup>, 曾燕<sup>1,2</sup>, 简平<sup>1,2</sup>

(1.四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心,四川 成都 611130;2.动物疫病与人类健康四川省重点实验室,四川 成都 611130)

**摘要:**为探明植物乳杆菌 BS22 对黄曲霉毒素的解毒作用及对肉鸡肠道菌群的影响,设饲料添加不同量的 BS22 试验(不饲喂)和饲料添加 BS22 饲喂肉鸡试验。在含有 50 μg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)的 1 kg 饲料中加入 10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup> CFU/g 植物乳杆菌 BS22,于加入 0、15、30 d 检测 AFB<sub>1</sub> 含量。检测结果:加入 BS22 后,各组饲料中的 AFB<sub>1</sub> 含量均显著下降;同一添加量下,随饲料贮存时间的增加,AFB<sub>1</sub> 含量均有所提高。肉鸡饲喂设 3 个组:I 组(对照组),饲喂基础日粮;II 组,饲喂基础日粮+50 μg/kg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>;III 组,饲喂基础日粮+50 μg/kg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>+1.0×10<sup>8</sup> CFU/g 植物乳杆菌 BS22。试验期为 28 d。采用 RCR-DGGE 比较 4 周龄肉鸡嗉囊、腺胃、十二指肠、空肠、回肠及盲肠内容物及黏膜细菌群落的结构。对消化道内容物而言,除回肠外,消化道其他部位的内容物的细菌多样性指数、均匀度和丰富度均是 III 组的高于 II 组和对照组;聚类图显示,除腺胃和盲肠外,其他部位均是 II 组与对照组聚在一起,而 III 组单独存在。对消化道黏膜而言,除空肠和盲肠外,其他部位的黏膜的细菌多样性指数和丰富度均是 II 组的均高于 III 组和对照组,且 III 组和对照组的细菌多样性指数相近或相同;除回肠和盲肠外,其他部位 III 组和对照组聚在一起,而试验 II 组单独存在。综合分析,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 对各肠段内容物菌群的作用不明显,对黏膜菌群有较大影响,尤其是对十二指肠的黏膜菌群影响更明显,植物乳杆菌 BS22 能调节由于黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 引起的肠道黏膜菌群失衡。

**关键词:**植物乳杆菌;黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>;肠道菌群;变性梯度凝胶电泳;多样性;肉鸡

中图分类号:S816.79 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2015)03-0286-08

## Effects of BS22, a kind of lactobacillus plantarum, on the adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> and intestinal flora in broiler chicken

Zhang Yan<sup>1,2</sup>, Zeng Dong<sup>1,2</sup>, Ni Xueqin<sup>1,2\*</sup>, Wang Jian<sup>1,2</sup>, Zeng Yan<sup>1,2</sup>, Jian Ping<sup>1,2</sup>

(1. Animal Microecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In order to investigate the detoxification of *Lactobacillus plantarum* BS22 on aflatoxin and its influence on gut microflora of broilers chicken, various amount of BS22 addition test with and without feeding were arranged. Test of 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> CFU/g amount of BS22 were added into the feedstuff with 50 μg of B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), and the AFB<sub>1</sub> content was measured after day 0, 15 and 30 day. The results showed that AFB<sub>1</sub> content in feeding group was significantly decreased after BS22 addition. While, it increased with the storage time of feedstuff at the same amount of addition. The test for feeding broilers, last for 28 days, was set into three groups, they were group I, basal diet (control group); group II, basal diet plus 50 μg/kg AFB<sub>1</sub>; group III, basal diet plus 50 μg/kg AFB<sub>1</sub> and *Lactobacillus plantarum* BS22 (1.0×10<sup>8</sup> CFU/g feed). Structure of bacterial communities and contents in glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum and

mucosa were compared using PCR-DGGE approach at the fourth week. The results showed that Shannon-Wiener index ( $H'$ ), Evenness ( $E_H$ ) and Richness ( $S$ ) in group III were higher than that in group II and group I for those contents in all gastrointestinal except for in ileum. Clustering diagram showed that group II and group I clustered together, group III, however, was separated in gastrointestinal except for in glandular stomach and in cecum. For those in mucosa, the Shannon-Wiener index ( $H'$ ) and Evenness ( $E_H$ ) in group II were higher than that in group III and group I in mucosa except for in jejunum and cecum. The Shannon-Wiener index ( $H'$ ) in group III and group I were the same or similar. Cluster analysis showed that group III and group I clustered together, while group II was separated in mucosa except for in ileum and cecum. In general, aflatoxin B<sub>1</sub> took little effect on the flora in intestinal contents, but had greater impact on mucosal flora. *Lactobacillus plantarum* BS22 could adjust the imbalance of mucosal flora caused by aflatoxin B<sub>1</sub>.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; aflatoxin B<sub>1</sub>; intestinal flora; Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE); diversity; broilers

黄曲霉毒素(AF)是一类主要由黄曲霉菌、寄生曲霉菌、特异曲霉和假溜曲霉等产生的次级代谢产物,具有极强毒性,其中,以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)的毒性最强。黄曲霉毒素主要污染玉米、花生、坚果等农作物及其制品<sup>[1]</sup>。目前,肉鸡感染黄曲霉毒素的检测指标主要有生长性能指标、血清生化指标、组织器官毒素残留指标等。1975年,Larsen等<sup>[2]</sup>研究指出,经 AFB<sub>1</sub> 处理后的仓鼠生长缓慢,并表现出 AFB<sub>1</sub> 毒性症状,肠道细菌数量下降。何明清等<sup>[3]</sup>指出,AFB<sub>1</sub> 可抑制正常菌群的生长繁殖,引起机体菌群变化,在临床上表现出一系列慢性中毒症状。

饲料中的黄曲霉毒素可经碱处理、氧化处理、生物降解等多种方法去毒。近些年,生物降解法成了研究的热点,许多微生物,包括细菌、酵母菌等都能吸附霉菌毒素。乳酸菌对 AFB<sub>1</sub> 吸附作用的研究始于 1995 年。目前,澳大利亚、日本和瑞典等国家开展这方面的研究较多。有研究<sup>[4]</sup>证明,乳酸菌属的许多菌株都具有吸附黄曲霉毒素的作用。马静等<sup>[5]</sup>研究发现,乳酸杆菌可以减少人体肠道对黄曲霉毒素的吸收,增加毒素排泄。Lahtinen 等<sup>[6]</sup>证实,鼠李糖乳杆菌菌株 GG(*L. rhamnosus* GG)能以物理结合方式除去培养介质中的 AFB<sub>1</sub>。笔者在含有 50 μg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的饲料中加入不同含量的植物乳杆菌 BS22,以研究 BS22 对 AFB<sub>1</sub> 的吸附效果,并用含有 AFB<sub>1</sub> 和 BS22 的饲料饲喂肉鸡,采用 PCR-DGGE 分析 AFB<sub>1</sub> 对肉鸡肠道不同部位内容物和黏膜中菌群的影响,探讨 BS22 对黄曲霉毒素的解毒作用及其对肉鸡肠道菌群的调节作用,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试 AFB<sub>1</sub> 含量大于 99%,购自北京华安麦科有限责任公司;植物乳杆菌 BS22 由四川农业大学动物微生物生态研究中心提供,保贮编号为 CCTCC:M2013010,活菌数为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL。

试验动物为 1 日龄健康艾维茵肉鸡 120 羽,体重 45 g 左右,购于温江正大畜禽有限责任公司。基础日粮采用玉米-豆粕型饲料,日粮组成及营养水平见表 1。

表 1 试验基础日粮组成及营养水平

日粮组成	含量/%	营养成分 <sup>③</sup>	含量
玉米	51.64	代谢能(ME, MJ/kg)	14.16
豆粕	39.60	粗蛋白质(CP, %)	21.17
菜籽油	4.30	蛋氨酸(Met, %)	0.49
DL-蛋氨酸	0.20	钙(Ca, %)	1.07
磷酸氢钙	1.85	总磷(AP, %)	0.71
碳酸钙	1.30		
食盐	0.40		
复合多维 <sup>①</sup>	0.03		
胆碱	0.18		
微量元素预混料 <sup>②</sup>	0.50		
合计	100.00		

复合多维为每千克全价料提供:维生素 A 40 000 IU、维生素 D<sub>3</sub> 10 000 IU、维生素 E 25 IU、维生素 K<sub>3</sub> 5 mg、维生素 B<sub>1</sub> 2 mg、维生素 B<sub>2</sub> 16 mg、维生素 B<sub>6</sub> 6 mg、维生素 B<sub>12</sub> 0.03 mg、烟酸 35 mg、D-泛酸钙 25 mg、叶酸 0.5 mg、抗氧化剂 0.5 mg; ② 每千克微量元素预混料含铁 100 mg、铜 25 mg、锌 120 mg、锰 70 mg、碘 0.8 mg、硒 1 mg; ③ 营养成分为计算值。

## 1.2 基础饲料添加 BS22 对 AFB<sub>1</sub> 的吸附试验(体外试验)

试验设 A、B、C、D、E 5 个组, 试验设计见表 2。

表 2 饲料添加 BS22 试验设计

Table 2 Experimental design of BS22 addition in feedstuff

组别	处理
A	1 kg 基础饲料
B	1 kg 基础饲料+ 50 μg AFB <sub>1</sub>
C	1 kg 基础饲料+ 50 μg AFB <sub>1</sub> + 10 <sup>6</sup> CFU/g 植物乳杆菌 BS22
D	1 kg 基础饲料+ 50 μg AFB <sub>1</sub> + 10 <sup>7</sup> CFU/g 植物乳杆菌 BS22
E	1 kg 基础饲料+ 50 μg AFB <sub>1</sub> + 10 <sup>8</sup> CFU/g 植物乳杆菌 BS22

分别于第 0、15、30 天时各采 1 次样, 每次混匀后采样 20 g, 放入样品袋, 编号, 置于 -20 °C 冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定不同时期饲料中 AFB<sub>1</sub> 的含量。检测方法和具体操作步骤按照深圳绿诗源生物技术有限公司 AFB<sub>1</sub> 检测 ELISA 试剂盒说明书进行。

## 1.3 肉鸡饲养试验

选用 1 日龄健康艾维茵肉鸡 120 羽, 随机分为 3 个组, 每组 4 个重复, 每个重复 10 羽。3 个组之间初始体重差异无统计学意义( $P>0.05$ )。试验期为 28 d。I 组(对照组), 饲喂基础日粮; II 组, 在基础日粮中添加 50 μg/kg AFB<sub>1</sub>; III 组, 在 1 kg 基础日粮中加 50 μg AFB<sub>1</sub> 和 0.1% 植物乳杆菌 BS22 ( $1 \times 10^8$ CFU/g)。试验鸡采用 2 层笼养, 自由饮水和采食, 24 h 光照。

## 1.4 消化道各部位内容物、黏膜采集及粪样 AFB<sub>1</sub> 检测

试验第 28 天采集供试鸡的粪便, 之后随机从各组取肉鸡 5 只宰杀, 采集消化道不同部位(嗉囊、腺胃、十二指肠、空肠、回肠和盲肠)内容物, 并将 5 只鸡相同部位的内容物混合均匀, 分装至 2 mL 离心管。同时采用无菌操作方法, 在冰上用解剖刀将消化道黏膜刮下, 置于装有生理盐水的离心管, 振荡均匀后各吸取 5 只鸡的混悬液 200 μL 混合, 分装至 2 mL 离心管, -80 °C 保存。收集的粪样按 1.2 中的方法检测 AFB<sub>1</sub> 含量。

参照文献[7]提取细菌总 DNA, 用核酸浓度测定仪测定总 DNA 浓度。

## 1.5 基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增

参照文献[8]中大肠杆菌 16S rRNA 基因 V<sub>3</sub> 片段 (339~539 bp) 设计引物: 上游引物 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'; 下游引物 5'-GTAT TACCGCGGCTGCTGGCAC-3'。PCR 反应体系(25 μL): 上、下游引物(10 pmol/μL)各 1.0 μL, 2×Taq Master Mix 12.5 μL, 总 DNA(模板)1.0~2.0 μL, 用双蒸水补至 25 μL, 同时设阴性对照管。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段大小和浓度。

## 1.6 PCR-DGGE 分析

PCR-DGGE 分析参照文献[9]进行。凝胶电泳梯度为 35%~65%(100%的变性剂包括 7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺), 变性方向与电泳方向一致。采用 1×TAE 作电泳缓冲液, 100 V、60 °C 电泳 14~16 h, 结果经硝酸银染色后用凝胶成像系统扫描图像。

## 1.7 割胶回收共性和特异性条带并克隆和测序

将 DGGE 图谱上的共性和特异性条带分别割胶回收并浸泡在 100 μL 加有 0.1% Triton X-100 的缓冲液中, 4 °C 过夜, 取 1 μL 作为模板, 按 1.5 中方法再次扩增 16S rDNA V<sub>3</sub> 区, 扩增产物进行 DGGE 电泳, 确认回收片段的正确性。重复该过程, 直至 DGGE 图谱上得到单一的特定条带为止。取 1 μL 回收纯化的 DNA 为模板, 采用 1.5 中方法扩增 V<sub>3</sub> 区, 不同的是使用不带 GC 发夹的引物, PCR 产物用于下一步克隆。

采用 pMD19-T 载体试剂盒, 参照使用手册对模板 PCR 产物进行连接, 再将其转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂布含氨苄青霉素的营养琼脂平板, 每条带选取 1~3 个阳性克隆送英潍捷基(上海)生物技术有限公司测序。应用 Chromas 2 软件对测定序列进行编辑, 非嵌合体序列在 GenBank 数据库中进行比对分析, 寻找亲缘关系最近的细菌并克隆。

## 1.8 数据分析

将 DGGE 图谱数字化、标准化后得到 1 个记录

DGGE 胶中条带迁移位置的数字化矩阵, 将矩阵导入 SPSS19 软件和 Quantity One 软件进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料中添加 BS22 对 AFB<sub>1</sub> 含量的影响

由表 3 可见, A 组 AFB<sub>1</sub> 的含量极低, B 组 AFB<sub>1</sub> 的含量与加入量相近。加入植物乳杆菌 BS22 后, 饲料中的 AFB<sub>1</sub> 含量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且随着加入的植物乳杆菌活菌量的增加, 饲料中 AFB<sub>1</sub> 的含量逐渐下降。同一添加量处理, 随饲料储存时间的增加, B、C、D、E 组 AFB<sub>1</sub> 含量均略有上升。

表 3 饲料中 AFB<sub>1</sub> 的含量

Table 3 The content of AFB<sub>1</sub> in feedstuff

组别	AFB <sub>1</sub> 含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
	0 d	15 d	30 d
A	(0.004±0.01)e	(0.006±0.01)e	(0.008±0.01)e
B	(49.17±0.09)a	(49.64±0.04)a	(50.14±0.01)a
C	(27.34±0.01)b	(27.45±0.03)b	(27.55±0.02)b
D	(24.34±0.02)c	(24.69±0.02)c	(25.82±0.05)c
E	(20.83±0.02)d	(22.55±0.04)d	(24.52±0.06)c

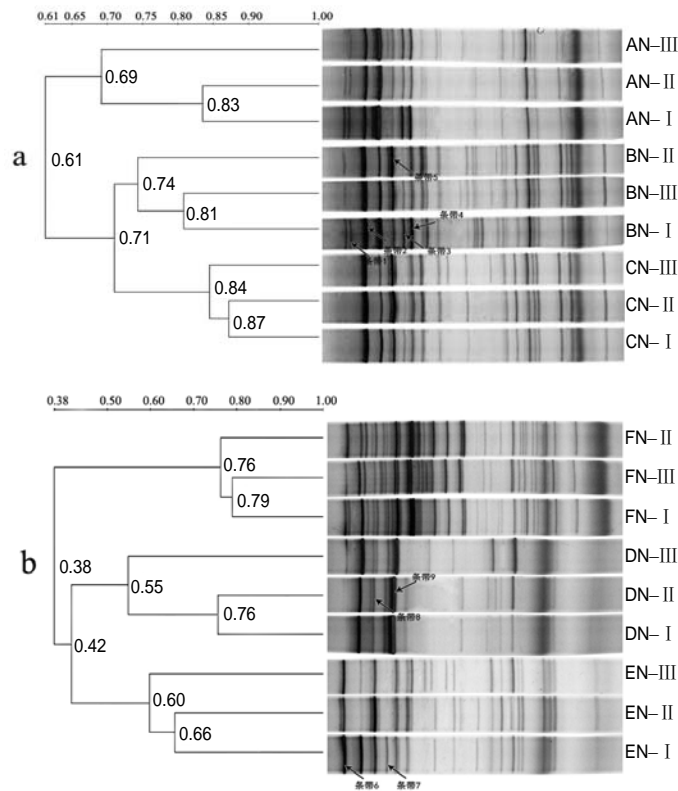
表中同列数据不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 饲料中添加 BS22 对肉鸡粪便中 AFB<sub>1</sub> 含量的影响

I 组(对照组)肉鸡粪便中 AFB<sub>1</sub> 的残留量为 (0.579±0.025)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , II 组(黄曲霉毒素组)肉鸡粪便中 AFB<sub>1</sub> 的残留量为 (0.937±0.048)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , II 组 AFB<sub>1</sub> 的残留量显著高于 I 组, 而加入植物乳杆菌 BS22 后, III 组 AFB<sub>1</sub> 的残留量为 (1.587±0.055)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 显著高于黄曲霉毒素组和对照组。上述结果表明, 植物乳杆菌 BS22 对 AFB<sub>1</sub> 有吸附作用, 使得蓄积在动物体内的 AFB<sub>1</sub> 含量减少, 而排出体外的 AFB<sub>1</sub> 含量增加。

### 2.3 消化道内容物细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱和多样性分析

图 1-a、b 显示, 不同部位内容物的细菌组成不一样, 其中盲肠中的细菌种类最丰富。对消化道内容物而言, 除回肠外, 其他部位 III 组的细菌多样性指数、均匀度和丰富度均高于 II 组和对对照组(表 4)。由图 1-a、b 聚类结果可知, 除腺胃和盲肠外, II 组与对照(I)组聚在一起, III 组单独存在; II 组与对照组(I)组的最高相似性为 87%, 最低相似性为 66%, 而 III 组与对照组(I)组的最高相似性为 79%, 最低相似性为 55%。



代号中N为内容物; A为嗉囊; B为腺胃; C为十二指肠; D为空肠; E为回肠; F为盲肠; I、II、III分别为对照组、II组、III组。

图 1 消化道内容物细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱和聚类结果

Fig.1 PCR-DGGE profiles and clustering results of 16S rDNA in V3 region from microbiota in gut content

表4 消化道内容物的细菌多样性指数、均匀度和丰富度

Table 4 Shannon-Wiener index ( $H'$ ), evenness ( $E_H$ ) and richness ( $S$ ) of microbiota in gut contents

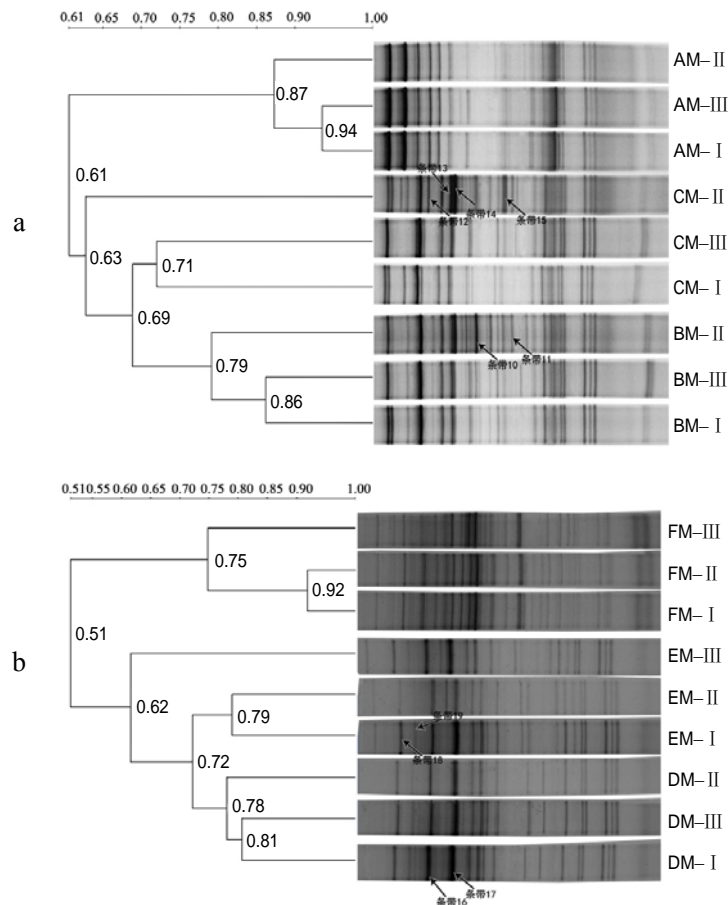
代号	多样性指数	均匀度	丰富度	代号	多样性指数	均匀度	丰富度
AN-I	2.83	0.72	17	DN-I	2.56	0.65	13
AN-II	2.83	0.72	17	DN-II	2.64	0.67	14
AN-III	3.00	0.76	20	DN-III	2.71	0.69	15
BN-I	3.26	0.83	26	EN-I	2.94	0.75	19
BN-II	3.22	0.82	25	EN-II	3.04	0.77	21
BN-III	3.30	0.84	27	EN-III	2.94	0.75	19
CN-I	2.89	0.74	18	FN-I	3.53	0.90	34
CN-II	2.89	0.74	18	FN-II	3.53	0.90	34
CN-III	3.00	0.76	20	FN-III	3.56	0.90	35

代号中N为内容物；A为嗉囊；B为腺胃；C为十二指肠；D为空肠；E为回肠；F为盲肠；I、II、III分别为对照组、II组、III组。

2.4 肉鸡消化道黏膜细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱和多样性分析

消化道黏膜细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱见图 2。除空肠和盲肠外，其他部位 II 组的黏膜细菌多样性指数和丰富度均高于 III 组和对照组(I)，且 III 组和 I 组的多样性指数相近或相同(表 5)。由图 2-a、b 可以看出，不同部位黏膜

的 DGGE 图谱条带数有差异，盲肠依然菌群最丰富。由图 2-a、b 聚类结果可看出，III 组与对照组(I 组)大部分聚在一起，而 II 组单独存在；III 组与对照组的最高相似性为 94%，最低相似性为 62%，而 II 组与对照组的最高相似性为 92%，最低相似性为 63%。



代号中A为嗉囊；B为腺胃；C为十二指肠；D为空肠；E为回肠；F为盲肠；M为黏膜；I、II、III分别为对照组、II组、III组。

图2 消化道黏膜细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱和聚类结果

Fig.2 PCR-DGGE profiles and clustering results of 16S rDNA in V3 region from microbiota in gut mucosa

表 5 消化道黏膜细菌的多样性指数、均匀度和丰富度

Table 5 Shannon–Wiener index (*H'*), Evenness (*E<sub>H</sub>*) and Richness (*S*) of microbiota in gut mucosa

代号	多样性指数	均匀度	丰富度	代号	多样性指数	均匀度	丰富度
AM-I	2.83	0.75	17	DM-I	2.77	0.73	16
AM-II	2.94	0.78	19	DM-II	2.71	0.72	15
AM-III	2.94	0.78	19	DM-III	2.77	0.73	16
BM-I	3.04	0.80	21	EM-I	3.04	0.81	21
BM-II	3.30	0.87	27	EM-II	3.09	0.82	22
BM-III	3.18	0.84	24	EM-III	3.00	0.79	20
CM-I	2.94	0.78	19	FM-I	3.47	0.92	32
CM-II	3.14	0.83	23	FM-II	3.43	0.91	31
CM-III	2.83	0.75	17	FM-III	3.40	0.90	30

代号中A为嗉囊；B为腺胃；C为十二指肠；D为空肠；E为回肠；F为盲肠；M为黏膜；I、II、III分别为对照组、II组、III组。

2.5 消化道各部位内容物及黏膜的共性和特异性菌群分析

在 DGGE 图谱上共割胶回收 19 条带，其中有 11 条共性条带和 8 条特异性条带(图 1、图 2 中箭头所指)。克隆测序后，在 GenBank 数据库中进行序列比对分析，找出了最相近的菌种(表 6)。7 个共性条带为优势菌群，分别为卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、巴氏链球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*) 和 瑞 士 乳 杆 菌

(*Lactobacillus helveticus*)。条带 1 和条带 7 分别是对照组肉鸡腺胃和空肠内容物的特异条带，为未培养细菌；条带 10 和条带 11 为 II 组腺胃黏膜的特异性条带，分别为未培养细菌和未培养的柔嫩梭菌属(*Uncultured Faecalibacterium* sp.)；条带 12、14 和 15 是 II 组十二指肠的特异条带，其中条带 12 为梭菌属(*Clostridium* sp.)，条带 14 为未培养的毛螺旋菌科(*Uncultured Lachnospiraceae* bacterium)。条带 17 和 19 是对照组和 III 组特有的条带，分别是不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) 和 拟 杆 菌 (*Bacteroidetes* bacterium)。

表6 DGGE共性条带和特异性条带的基因片段序列的BLAST分析

Table 6 BLAST analysis of genomic sequences in common bands and special bands in DGGE

条带号	序列长度/bp	GenBank 中最相近的菌种名称(登录号)	相似性/%	备注
1	151	Uncultured bacterium (JF260833.1)	99	共性
2	156	<i>Lactobacillus crispatus</i> (KF684066.1)	100	共性
3	156	<i>Lactobacillus salivarius</i> (KF588360.1)	97	共性
4	157	<i>Actinobacterium</i> SL-11 (KC817538.1)	99	共性
5	156	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (KF548315.1)	100	共性
6	156	<i>Lactobacillus amylovorus</i> strain FQ103 (KF418830.1)	100	共性
7	151	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone C-5-1 (KF827076.1)	97	
8	151	<i>Flavobacterium</i> sp. S146.08.SCU.W.Gill.N (JX287651.1)	99	共性
9	157	<i>Streptococcus pasteurianus</i> strain (KF767899.1)	99	共性
10	131	Uncultured <i>Faecalibacterium</i> sp. (KF508452.1)	98	
11	151	Uncultured organism clone ELU0116-T290-S-NI_000056 (HQ789275.1)	100	
12	134	<i>Clostridium</i> sp. AUH-JLC235 (GU128175.1)	100	
13	134	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium gene (AB702856.1)	97	共性
14	131	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium(KF505051.1)	100	
15	131	Uncultured bacterium clone E416QYJ01FDJ2R(HQ295900.1)	100	
16	156	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain M3-1 (AM117137.1)	99	共性
17	157	<i>Acinetobacter</i> sp. NM-18 (JQ765576.1)	99	
18	157	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone DVBSD_J362 (KF463964.1)	100	共性
19	151	<i>Bacteroidetes</i> bacterium zo31 (AF531002.1)	97	

### 3 结论与讨论

Gong 等<sup>[10]</sup>曾提出 5 个以上的个体样品混合才能代表整体的菌群组成。为减少个体差异对试验结果的影响,本试验中采取 5 只鸡相同部位的内容物混合后提总 DNA,在减少样本数量的同时,保证了试验结果不受个体差异的影响。对消化道内容物菌群而言,聚类结果是大部分肠段 II 组与对照组聚在一起,表明 AFB<sub>1</sub> 对内容物菌群的作用不明显。目前,有关毒素对肠道微生物种群及发酵影响的数据仍缺乏<sup>[11]</sup>。Sutic 等<sup>[12]</sup>研究指出,植物乳杆菌、干酪乳杆菌等可在 AFB<sub>1</sub> 的影响下利用葡萄糖等发酵产气,但也未得到任何有意义的证据可证明 AFB<sub>1</sub> 对肠道菌群多样性产生了影响。关于 AFB<sub>1</sub> 直接对黏膜菌群影响的研究目前尚少见报道,但其可引起黏膜损伤,间接影响肠道菌群结构。Agag 等<sup>[13]</sup>和 Ul-Hassan 等<sup>[14]</sup>分别证明 AFB<sub>1</sub> 可抑制机体自身的免疫力,导致寄生细菌和病毒感染宿主。本试验结果显示,除腺胃外,其他部位 II 组的菌群多样性指数均高于对照组,可能是 AFB<sub>1</sub> 损伤黏膜组织,降低了肠道免疫功能,导致一些病原菌和寄生细菌的入侵,从而使黏膜细菌多样性增加。Aboutalebi 等<sup>[15]</sup>研究指出,AFB<sub>1</sub> 可引起十二指肠绒毛增生和黏膜的损伤。Fernandez 等<sup>[16]</sup>研究了 AFB<sub>1</sub> 对羔羊回肠黏膜免疫分子细胞数量的影响,结果证明 AFB<sub>1</sub> 使回肠黏膜上的 SIgA 细胞数量明显减少。SIgA 是黏膜的主要免疫分子<sup>[17-18]</sup>,SIgA 的减少使回肠黏膜免疫系统受到损伤。Ramos 等<sup>[19]</sup>研究了 AFB<sub>1</sub> 在大鼠的小肠部位吸收的机制,结果表明 AFB<sub>1</sub> 高速通过小肠,几乎可全部被肠道吸收,尤其在十二指肠的吸收效果最明显。本试验结果显示,II 组与对照组十二指肠段黏膜的菌群相似性相当低,仅为 63%,说明 AFB<sub>1</sub> 基本在十二指肠被吸收,并对黏膜菌群多样性造成了较大的影响,故 AFB<sub>1</sub> 组(II 组)与对照组的细菌多样性存在较大差异。

本研究结果表明,III 组大多数肠段内容物的细菌多样性指数高于对照组和 II 组,III 组消化道各部位黏膜细菌多样性指数和对照组的值相同或相近,说明饲喂植物乳杆菌 BS22 可增加肉鸡肠道微生物的数量和多样性,这与郭元晟<sup>[20]</sup>的研究结果相似。El-Nezami 等<sup>[21]</sup>的研究证明了乳酸杆菌和丙酸杆菌属可去除鸡十二指肠的 AFB<sub>1</sub>,并能在一定程度

上改善由于 AFB<sub>1</sub> 引起的黏膜损伤,从而调整黏膜菌群趋于正常。

消化道内容物不同部位条带测序得到的优势菌群主要是乳杆菌,如唾液乳杆菌、嗜酸乳杆菌,该结果与潘康成等<sup>[24]</sup>的研究结果相似。对照组腺胃和空肠段特异条带是未培养的微生物,而 II 组和 III 组在各肠段均无特异性条带,进一步说明 AFB<sub>1</sub> 对肠道内容物菌群无明显影响。黏膜各肠段测序结果显示,II 组有较多的特异条带。有研究报道 AFB<sub>1</sub> 让机体肠道组织中毒的机制包括抑制氧的产生<sup>[25]</sup>、抑制氧自由基<sup>[26]</sup>等,造成机体内环境处于厌氧状态。本研究中 II 组的特异性条带 12 和 14 分别是梭菌属(*Clostridium* sp.)和未培养毛螺菌科(Uncultured *Lachnospiraceae* bacterium),前者是专性厌氧菌,后者是严格厌氧菌,表明 AFB<sub>1</sub> 可能如上述文献报道,抑制了黏膜组织上氧的产生,使机体处于厌氧或严重厌氧状态,从而使未培养毛螺菌科(Uncultured *Lachnospiraceae* bacterium)能在黏膜上定植,改变黏膜菌群结构。

综上所述,AFB<sub>1</sub> 对肉鸡肠道内容物菌群结构的作用不明显,但其可引起黏膜损伤,从而导致黏膜菌群结构发生改变。添加植物乳杆菌 BS22 对 AFB<sub>1</sub> 引起的肠道黏膜菌群失调具有调节作用。

#### 参考文献:

- [1] Gourama H, Bullerman L B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species[J]. Journal of Food Protection, 1995, 58(11): 1249-1256.
- [2] Larsen A B, Cysewski S J, Miller J M. Effect of aflatoxin on susceptibility of hamsters to mycobacterium paratuberculosis[J]. American Journal of Veterinary Research, 1975, 36(10): 1545-1547.
- [3] 何明清,程安春. 动物微生态学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004.
- [4] 关舒,胡新旭,马秋刚,等. 黄曲霉毒素的传统降解方法和生物降解研究进展[J]. 饲料工业,2008,29(24): 57-59.
- [5] 马静,拳惠莲,唐志红,等. 乳酸杆菌对人体肠道黄曲霉毒素排泄的影响[J]. 广州食品工业科技,2003,19(21): 23-26.
- [6] Lahtinen S J, Haskard C A, Ouwehand A C et al. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG[J]. Food Additives and Contaminants, 2004, 21(2): 158-164.

- [7] Li M ,Gong J ,Cottrill M ,et al .Evaluation of QIAamp® DNA stool mini kit for ecological studies of gut microbiota[J] . Journal of Microbiological Methods , 2003 , 54(1) : 13–20 .
- [8] Walter J , Hertel C , Tannock G W , et al . Detection of *Lactobacillus* , *Pediococcus* , *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology , 2001 , 67(6) : 2578–2585 .
- [9] 倪学勤 , 曾东 , 周小秋 . 采用 PCR–DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J] . 畜牧兽医学报 , 2008 , 39(7) : 955–961 .
- [10] Gong J , Si W , Forster R J . et al . 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts : From crops to ceca[J] . Fems Microbiology Ecology , 2007 , 59(1) : 147–157 .
- [11] Yunus A W , Razzazi-Fazeli E , Bohm J . Aflatoxin B<sub>1</sub> in affecting broiler's performance , immunity , and gastrointestinal tract :A review of history and contemporary issues[J] . Toxins , 2011 , 3(6) : 566–590 .
- [12] Sutic M , Banina A . Influence of aflatoxin B<sub>1</sub> on gas production by lactic acid bacteria[J] . Journal of Environmental Pathology , Toxicology and Oncology : Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer , 1989 , 10(3) : 149–153 .
- [13] Agag B I . Mycotoxins in foods and feeds : 1-aflatoxins[J] . Ass Univ Bull Environ Research , 2004 , 7(1) : 173–205 .
- [14] Ul-Hassan Z , Zargham Khan M , Khan A , et al . Immunological status of the progeny of breeder hens kept on ochratoxin A (OTA)-and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-contaminated feeds[J] . Journal of Immunotoxicology , 2012 , 9(4) : 381–391 .
- [15] Aboutalebi N , Toxic M . Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on duodenum tissue[J] . American Journal of Science , 2013 , 9(3S) : 115–117 .
- [16] Fernandez A , Hernandez M , Verde M T , et al . Effect of aflatoxin on performance , hematology , and clinical immunology in lambs[J] . Canadian Journal of Veterinary Research-revue Canadienne de Recherche Veterinaire , 2000 , 64(1) : 53–58 .
- [17] Peterson D A , McNulty N P , Guruge J L , et al . IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis[J] . Cell Host & Microbe , 2007 , 2(5) : 328–339 .
- [18] Mantis N J , Rol N , Corthésy B . Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut[J] . Mucosal Immunology , 2011 , 4(6) : 603–611 .
- [19] Ramos A J , Hernandez E . In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine[J] . Mycopathologia , 1996 , 134(1) : 27–30 .
- [20] 郭元晟 . 乳酸杆菌对肉鸡生产性能 , 免疫机能及肠道菌群的影响[D] . 呼和浩特 : 内蒙古农业大学 , 2011 .
- [21] El-Nezami , Hani . Ability of *Lactobacillus* and *Propioni* bacterium strains to remove aflatoxin B<sub>1</sub> from the chicken duodenum[J] . Journal of Food Protection , 2000 , 63(4) : 549–552 .
- [22] Zuo R , Chang J , Yin Q , et al . Effect of the combined probiotics with aflatoxin B<sub>1</sub>-degrading enzyme on aflatoxin detoxification , broiler production performance and hepatic enzyme gene expression[J] . Food and Chem Toxicol , 2013 , 59 : 470–475 .
- [23] Biernasiak J , Piotrowska M , Libudzisz Z . Detoxification of mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens[J] . Mycotoxin Research , 2006 , 22(4) : 230–235 .
- [24] 潘康成 , 陈正礼 , 崔恒敏 , 等 . 利用 ERIC–PCR 和 PCR–DGGE 技术分析喂服枯草芽孢杆菌肉鸡肠道菌群的多样性[J] . 动物营养学报 , 2010 , 22(4) : 985–991 .
- [25] Uwaifo O A . Reversion by vitamin K of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-induced inhibition of oxygen uptake in three AFB<sub>1</sub>-susceptible bacteria[J] . Toxicol Lett , 1983 , 15(1) : 57–60 .
- [26] Atroshi F , Rizzo A , Westermarck T , et al . Effects of tamoxifen , melatonin , coenzyme Q10 and l-carnitine supplementation on bacterial growth in the presence of mycotoxins[J] . Pharmacol Research , 1998 , 38(4) : 289–295 .

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 王 库