



李佳晖,王硕,龙淼. 贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌联合使用对饲喂霉变饲料肉鸡生产性能和肠道损伤的影响[J]. 中国农业大学学报,2024,29(04):215-225.
LI Jiahui, WANG Shuo, LONG Miao. Effect of combined use of *Bacillus velezensis* and *Pediococcus pentosaceus* on the production performance and intestinal damage of broilers fed with moldy feed[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(04): 215-225.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.04.19

贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌联合使用对饲喂霉变饲料肉鸡生产性能和肠道损伤的影响

李佳晖^{1,2} 王硕¹ 龙淼^{1*}

(1. 沈阳农业大学 动物科学与医学学院/重要家畜疫病研究教育部重点实验室, 沈阳 110161;
2. 通化县果松镇综合服务中心, 吉林 通化 134103)

摘要 为分析贝莱斯芽孢杆菌与戊糖片球菌联合使用对饲喂霉变饲料肉鸡的生产性能与肠道损伤的影响,本研究选取96只1日龄白羽肉鸡公雏,随机平均分为空白组、攻毒组、益生菌组和解毒组。每组3个重复,每个重复8只鸡,试验周期为21 d。统计并比较分析不同组肉鸡体重、采食量、料重比;利用ELISA检测血清生化指标的变化;应用荧光定量PCR法检测空肠组织紧密连接蛋白和炎症因子mRNA表达水平的变化;应用病理组织学观察各组肉鸡肠道结构的变化。结果表明:1)与攻毒组相比,解毒组21日龄肉鸡的体重、平均采食量和平均日增重均显著高于攻毒组($P<0.05$)。2)与攻毒组相比,解毒组肉鸡的血清SOD活性、GSH-px活性和MDA含量显著降低($P<0.05$),T-AOC含量极显著升高($P<0.01$),各项血清生化指标均显著回调($P<0.05$)。3)与攻毒组相比,解毒组肉鸡空肠绒毛形态显著改善,空肠组织中CIT含量极显著升高($P<0.01$),DAO、D-乳酸和IFABP含量均发生极显著降低($P<0.01$)。4)与攻毒组相比,解毒组肉鸡空肠紧密连接蛋白相关基因闭锁蛋白1(*ZO-1*),闭合蛋白(*Occludin*)和紧密连接蛋白1(*Claudin-1*)的mRNA表达水平极显著上升($P<0.01$)。5)与攻毒组相比,解毒组肉鸡空肠炎症因子白介素6(*IL-6*)、白介素8(*IL-8*)和肿瘤坏死因子 α (*TNF- α*)的mRNA表达水平均发生极显著回调($P<0.01$),白介素1(*IL-1*)的mRNA表达水平均发生显著回调($P<0.05$)。综上,贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌联合使用可改善霉变饲料造成的肉鸡生产性能下降,减轻霉变饲料导致的肉鸡肠道形态学改变、屏障损伤与炎症反应。本研究为生产实践中联合使用这2株益生菌作为饲料添加剂防控畜禽霉菌毒素中毒提供理论和实践基础。

关键词 霉菌毒素; 益生菌; 肉鸡; 空肠炎症; 肠道屏障

中图分类号 S858.3

文章编号 1007-4333(2024)04-0215-11

文献标志码 A

Effect of combined use of *Bacillus velezensis* and *Pediococcus pentosaceus* on the production performance and intestinal damage of broilers fed with moldy feed

LI Jiahui^{1,2}, WANG Shuo¹, LONG Miao^{1*}

(1. Key Laboratory of Important Livestock Diseases of Ministry of Education/College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. Comprehensive Service Center of Guosong Town, Tonghua County, Tonghua 134103, China)

Abstract To analyze the effects of the combination of *Bacillus subtilis* and *Pediococcus pentosaceus* tablets on the performance and intestinal damage of broilers fed moldy feed, 96 1-day-old white feather broiler

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32273074;31972746;31872538;31772809);辽宁省教育厅重点项目(LJKZ0632)

第一作者: 李佳晖(ORCID: 0009-0008-9239-4559), 硕士研究生, E-mail: 1245272342@qq.com

通讯作者: 龙淼(ORCID: 0000-0001-6683-1956), 教授, 主要从事畜禽临床疾病防治, E-mail: longmiao@syau.edu.cn

male chicks were randomly divided into a blank group, an attack group, a probiotic group and a detoxification group. Each group had 3 replicates, each with 8 chicks, and the test period was 21 d. The changes in body weight, feed intake and feed-to-weight ratio of broilers in different groups were counted and compared. Changes in serum biochemical indexes were detected by ELISA, and changes in the expression levels of proteins of the jejunum and inflammatory factor mRNA were detected by fluorescence PCR, and changes in the intestinal structure of broilers were observed by histopathology. The results showed that: 1) Compared with the attack group, the body weight, average feed intake, and average daily weight gain of 21-day-old broilers in the detoxification group were significantly higher ($P < 0.05$). 2) Compared with the attack group, the serum SOD activity, GSH-px activity and MDA content of broilers in the detoxification group were significantly decreased ($P < 0.05$), the T-AOC content was highly significantly increased ($P < 0.01$), and all the serum life indexes were significantly regressed ($P < 0.05$). 3) Compared with the attack group, the morphology of jejunal villi of broilers in the detoxification group was significantly improved, the citrulline (CIT) content in jejunal tissues was highly significantly elevated ($P < 0.01$), and highly significant reductions in the contents of diamineoxidase (DAO), D-lactic acid and intestinal fatty acid binding protein (IFABP) occurred ($P < 0.01$). 4) The mRNA expression levels of the jejunal tight junction protein-related genes occludin 1 (*ZO-1*), *occludin* and *claudin-1* were highly significantly increased in the detoxification group compared with the attack group ($P < 0.01$). 5) Compared with the attack group, the mRNA expression levels of the broiler jejunal inflammatory factors *IL-6*, *IL-8* and *TNF- α* were all highly significantly ($P < 0.01$) returned in the detoxification group, and the mRNA expression level of *IL-1 β* , was significantly ($P < 0.05$) returned in the detoxification group. In conclusion, the combined use of *Bacillus subtilis* and *Pediococcus pentosaceus* can improve the decline in broiler performance caused by moldy feed, reduce the morphological changes, barrier damage and inflammatory response of the intestinal tract of broilers caused by moldy feed. This study can provide a theoretical and practical basis for the combined use of these two probiotics as feed additives in production practice to prevent and control mycotoxin poisoning.

Keywords mycotoxins; probiotics; broilers; jejuno-intestinal inflammation; intestinal barrier

益生菌常作为饲料添加剂用于畜禽。益生菌具有许多益生作用,主要包括杀死或抑制致病菌、抗病毒、调节免疫反应,改善肠道菌群,增强肠道屏障功能,促进营养利用等作用^[1-2]。近年来,研究发现益生菌具有吸附或降解霉菌毒素作用。如蔬菜芽孢杆菌 F6 在体外脱毒黄曲霉毒素 B1(AFB1)的能力达到 83%^[3],解淀粉芽孢杆菌 G-6 能够 100% 降解可溶性淀粉、玉米粉、豆粕粉中的玉米赤霉烯酮(ZEA)^[4]。据报道很多益生菌可降低真菌毒素对动物机体造成的损伤。如鼠李糖乳杆菌 RC007 可降低脱氧雪腐镰刀菌烯醇对猪空肠毒性^[5],枯草芽孢杆菌 ANSB168 可减轻赭曲霉毒素 A(OTA)引起的肉鸡免疫损伤和炎症^[6]。本实验室分离鉴定的贝莱斯芽孢杆菌 A2 可以对 ZEA 造成小鼠的肝肾损伤起到保护作用^[7-8]。同时分离鉴定的戊糖片球菌 xy46 也已被证明可以缓解 ZEA 对雄性小鼠生殖系统造成的生殖毒性^[9]。但目前关于益生菌联合使用对于动物霉菌毒素中毒的防控作用的相关研究还

较少。同时,霉菌毒素造成的污染通常不是单一类型,而是混合类型。因此,本研究将本实验室分离鉴定的具有脱毒效果的 2 种益生菌联合使用,探讨能否降低霉菌毒素对肉鸡生长性能以及肠道损伤的影响,该研究为今后联合使用益生菌株来拮抗饲料中霉菌毒素引发的畜禽中毒奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

赭曲霉菌 (*Aspergillus ochraceus* AS3.3876, AO) 分离株购于广东省微生物研究所。禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum* 3.4521) 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus* 3.4408) 购于中国科学院微生物研究所。益生菌株由沈阳农业大学动物科学与医学学院临床教研室提供。贝莱斯芽孢杆菌 A2 (中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCCNO: M2018352), 戊糖片球菌 xy46 (中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCCNO: M2018363)。经测

定,本批次含贝莱斯芽孢杆菌 A2 活菌数 9×10^8 CFU/g(芽孢形成率 93.6%),戊糖片球菌 xy46 活菌数 9×10^8 CFU/g。由 2 株菌按照 1:1 比例进行混合,活菌数为 9×10^8 CFU/g。

1.2 发霉饲料制备及毒素含量测定

将基础饲料粉碎后,在 105°C 的烘箱干燥灭菌 48 h,均匀平铺于灭菌室地板,厚度约 8 cm,分别接种赭曲霉、黄曲霉和禾谷镰刀菌的分生孢子悬浮液,并在 30°C 间温育 14 d,每天将 0.3 L 高压灭菌的无血清细胞培养基(CDM)与 0.7 L 超纯水混合,每日分早晚 2 次喷洒接种到 3 kg 饲料粉并混匀。除赭曲霉菌外,所有操作均在无菌环境中穿着防护服进行。培养第 21 天后终止培养,收集发霉的饲料粉,并在 120°C 高压灭菌 15 min。霉菌毒素组饲料配制时通过梯度稀释法进行。发霉饲料经甲醇抽提后,分别通过 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{冰醋酸}}=99:99:2$ 、 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=100:100$ 、 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ 的流动相浸提后采用高效液相色谱法定量测定 OTA、AFB1 和 ZEA 3 种霉菌毒素的含量。经高效液相色谱法测定,本次制备的饲料中含 OTA 为 2.76 mg/kg(高于中国标准限量 0.10 mg/kg 和欧盟标准限量 0.25 mg/kg),AFB1 为 1.52 mg/kg(高于中国标准限量 0.05 mg/kg 和欧盟标准限量 0.02 mg/kg)和 ZEA 为 4.62 mg/kg(高于中国标准限量 0.5 mg/kg 和欧盟标准限量 2 mg/kg)。

1.3 试验设计

选用 96 只 1 日龄健康的初始体重为 (40 ± 0.5) g 的白羽肉鸡公雏(沈阳禾丰牧业有限公司),随机平均分为 4 组,每组 3 个重复,每个重复 8 只鸡。试验期为 21 d。处理 A 为空白组,饲喂正常饲料。处理 B 组为益生菌对照组,饲喂正常日粮和添加量为 0.7% 的益生菌。处理 C 组为攻毒组,给予饲喂发霉饲料(发霉饲料含霉菌毒素的浓度见 1.2)。处理 D 组为解毒组,饲喂发霉饲料中添加量为 0.7% 的益生菌。肉仔鸡自由采食,充足饮水,按正常免疫程序进行免疫接种。

1.4 样品采集

21 日龄时,每只肉鸡采用翅根静脉采血 1 mL, 37°C 静置凝血,分离血清备用。之后处死所有处理组肉鸡,取空肠组织,每组随机选取 6 只肉鸡将其组织部分放入 4% 的多聚甲醛中浸泡充分固定 24 h 后,用于 HE 染色。剩余部分组织经预冷 PBS 冲洗后,迅速过液氮保存于 -80°C 冰箱。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 生长性能测定

试验开始和结束时,对肉鸡进行空腹称重,计算平均日增重。试验期间,每天 7:00 之前称量添加的饲料,每日晚上 19:00 称量剩余的饲料量,计算平均日采食量,根据平均日采食量,计算料重比。

1.5.2 肉鸡空肠组织病理学测定

每组随机选择 6 只肉鸡,并取出空肠组织。利用石蜡包埋、切片、HE 常规染色。并用光学显微镜观察各组肉鸡空肠组织形态变化,并进行拍照记录和分析。

1.5.3 血清生化指标测定

血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)及丙二醛(MDA)含量。本试验具体操作步骤严格按照南京建成生物工程研究所试剂盒的说明书进行操作。

1.5.4 空肠组织屏障指标测定

取 1 g 肉鸡空肠组织使用组织匀浆仪进行组织匀浆,检测肉鸡空肠组织中的瓜氨酸(CIT)、肠型脂肪酸结合蛋白(IFABP)、D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)含量,评估肉鸡肠道损伤程度。本试验严格按照 BMASSAY 试剂盒的说明书进行操作。

1.5.5 空肠组织炎症因子与紧密连接基因 mRNA 表达水平的测定

根据诺唯赞生物科技股份有限公司提供的总 RNA 提取试剂盒说明书提取肉鸡空肠组织总 RNA,使用反转录试剂盒进行反转录,以及 qPCR 试剂盒进行 qPCR 反应,检测 *Occludin*、*ZO-1*、*Claudin-1*、*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8*、内参基因 *β -actin* 的表达水平,反应条件如下: 95°C 预变性 30 s,循环反应 40 次: 95°C , 10 s; 60°C , 30 s, 95°C , 15 s。数据结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法表达试验组相对于空白对照组的 mRNA 表达水平的变化。所需引物均在生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

1.6 数据统计分析

是采用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析和一般线性模型单变量双因素方差分析处理,并用 Duncan 氏和 LSD 法进行多重比较,结果用平均值 \pm 标准差表示。血清生化指标、空肠组织屏障指标、紧密连接蛋 mRNA 表达水平和炎症因子 mRNA 表达水平的数据经由分析软件 SPSS 26.0 进行 One Way

表1 用于qPCR分析的引物信息
Table 1 Primer information for qPCR analysis

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段长度/bp Length
内参 <i>β-actin</i>	F: CTGTCCCTGTATGCCTCTG R: TTGATGTCACGCACGATT	221
闭合蛋白 (<i>Occludin</i>)	F: CTGCTCTGCCTCATCTGCTTCTTC R: CCATCCGCCACGTTCTTACC	145
闭锁蛋白1 (<i>ZO-1</i>)	F: TCTTCCTCCTCCCGCTTCTTAC R: AGAGATGGTGGTGTAGGCAGTGG	149
紧密连接蛋白1 (<i>Claudin-1</i>)	F: GACCAGGTGAAGAAGATGCGGATG R: CGAGCCACTCTGTTGCCATACC	151
肿瘤坏死因子 α (<i>TNF-α</i>)	F: CCCAGTTCAGATGAGTTGCCCTTC R: GCCACCACACGACAGCCAAG	156
白细胞介素1 β (<i>IL-1β</i>)	F: CAGAAGAAGCCTCGCCTGGATTC R: GCCTCCGCAGCAGTTTGGTC	156
白细胞介素6 (<i>IL-6</i>)	F: AAATCCCTCCTCGCCAATCT R: CCCTCACGGTCTTCTCCATAAA	218
白细胞介素8 (<i>IL-8</i>)	F: GACCCCAAGGAAAGTGGGT R: TGACCAGCACAGGAATGAGG	189

ANOVA单因素方差分析,经Excel进行统计与计算,绘制出图表。结果用平均值±标准误表示。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 益生菌联合使用对肉鸡生长性能的影响

如表2所示,与空白组相比,攻毒组21日龄肉鸡体重、平均日采食量、平均日增重均显著低于空白组。与攻毒组相比,解毒组21日龄肉鸡体重显著高于攻毒组($P < 0.05$),并接近空白组,同时,解毒组肉鸡平均日采食量、平均日增重均显著高于攻毒组($P < 0.05$)。值得注意的是,与空白组相比,益生菌组试验肉鸡21日龄体重、平均日采食量、平均日增重均显著高于空白组($P < 0.05$)。但四组肉鸡料重比无显著差异。结果表明,2株益生菌的联合使用,降低了发霉饲料中真菌毒素对肉鸡生产性能的影响。

2.2 益生菌联合使用对肉鸡空肠组织形态的影响

肉鸡空肠组织HE染色结果如图1所示。空白组肉鸡空肠肠腺结构在固有层排列整齐,无明显断

裂,空肠绒毛形态完整规律(图1(a))。益生菌组无任何异常出现,较为接近空白组(图1(b))。与对照组相比,饲喂发霉饲料的肉鸡,绒毛排列不规律,甚至断裂。此外,攻毒组空肠组织可见大量出血点,同时存在炎性细胞浸润(图1(c))。可见肠隐窝深度增长($P < 0.01$),肠绒毛长度缩短($P < 0.01$)(图2),解毒组与攻毒组相比,空肠绒毛形态得到显著改善,虽然仍存在少量出血点,但是无其他异常(图1(d))。说明2株益生菌的联合使用,降低了发霉饲料中真菌毒素对肉鸡肠道形态的损伤。

2.3 益生菌联合使用对肉鸡血清生化指标的影响

如图3所示,与空白组相比,攻毒组中21日龄肉鸡血清SOD活性($P < 0.01$)和T-AOC含量极显著降低($P < 0.01$),GSH-px活性($P < 0.01$)和MDA含量极显著升高($P < 0.01$)。与攻毒组相比,解毒组肉鸡血清SOD活性、GSH-px活性和MDA含量显著降低($P < 0.05$),T-AOC含量极显著升高($P < 0.01$),各项血清生活指标均有显著回调。值得注意的是,益生菌组与空白组相比无显著变化,甚至益生菌组中

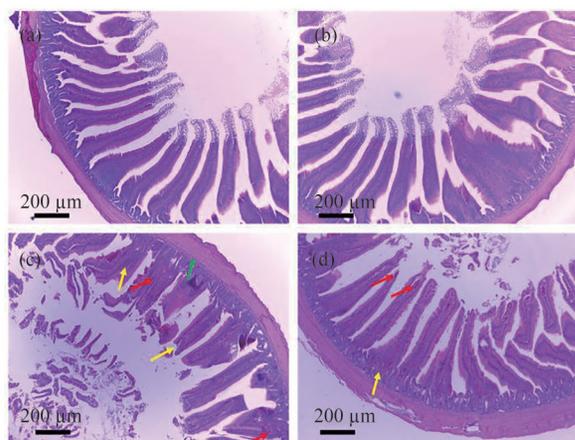
表2 益生菌联合使用对肉鸡生长性能的影响

Table 2 The effect of probiotics combined use on the growth performance of broilers

项目 Item	空白组 Blank group	益生菌组 Probiotics group	攻毒组 Toxic group	解毒组 Detoxification group
初始体重/g	40.60±1.51	40.62±1.30	39.19±0.80	39.45±0.75
21日龄体重/g	845.08±16.75 a	931.20±27.25 b	659.40±18.66 c	840.23±28.06 a
平均日采食/(g/d)	77.81±2.03 a	84.38±2.11 b	61.42±1.57 c	77.50±1.87 a
平均日增重/(g/d)	38.31±1.06 a	42.41±1.32 b	29.53±1.08 c	38.13±1.22 a
料重比/(g/g)	(2.03±0.05):1	(1.99±0.06):1	(2.08±0.04):1	(2.03±0.04):1

注: 纵向肩标字母相同或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: Vertical shoulder markers with the same or no letters indicate no significant difference ($P>0.05$), lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), and uppercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).



(a)对照组;(b)益生菌组;(c)攻毒组;(d)解毒组。图中绿色箭头表示肠隐窝深度增长,红色箭头表示有大量出血点,黄色箭头表示炎性细胞浸润。

(a) Control group; (b) Probiotic group; (c) Attack group; (d) Detoxification group. Green arrows in the figure indicate the intestinal crypt depth growth, red arrows indicate the numerous bleeding spots, and yellow arrows indicate the inflammatory cell infiltration.

图1 肉鸡空肠组织病理组织学检测

Fig. 1 HE staining of broiler jejunum

GSH-px 活性略微升高。说明 2 株益生菌的联合使用,降低了发霉饲料中霉菌毒素对肉鸡的氧化损伤。

2.4 益生菌联合使用对肉鸡空肠组织屏障指标的影响

如图 4 所示,与空白组相比,攻毒组中肉鸡空肠组织中 CIT 含量极显著降低 ($P<0.01$),DAO、D-乳酸和 IFABP 含量均发生极显著升高 ($P<0.01$)。

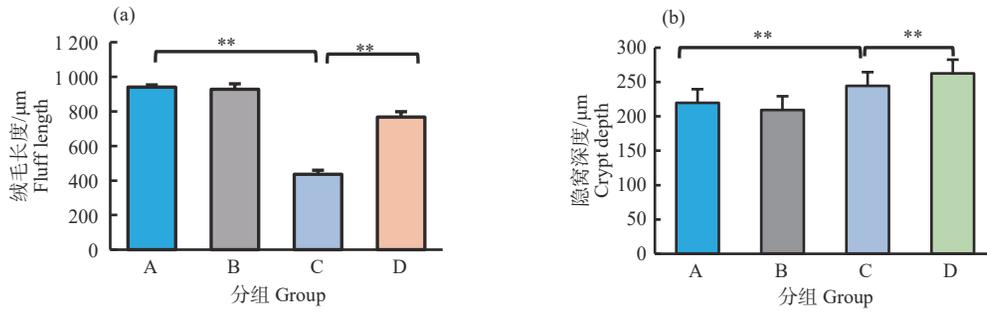
与攻毒组相比,解毒组空肠组织 CIT 含量极显著升高 ($P<0.01$),DAO、D-乳酸和 IFABP 含量均发生极显著降低 ($P<0.01$)。此外,解毒组与空白组相比,饲料中添加益生菌后能够极显著降低空肠 IFABP 含量 ($P<0.01$)。结果说明,发霉饲料引起空肠组织屏障损伤,而添加 2 株益生菌后,显著缓解了霉菌毒素对空肠组织屏障损伤。

2.5 益生菌联合使用对空肠组织紧密连接蛋白 mRNA 表达水平的影响

如图 5 所示,与空白组相比,益生菌组的 ZO-1 相对 mRNA 表达量极显著升高 ($P<0.01$),攻毒组的 ZO-1 相对 mRNA 表达量无显著差异。与攻毒组相比,解毒组的 ZO-1 相对 mRNA 表达量发生极显著上调 ($P<0.01$);与空白组相比,攻毒组的 Occludin 相对 mRNA 表达量极显著下调 ($P<0.01$),但是解毒组的 Occludin 的相对 mRNA 表达量得到极显著回调 ($P<0.01$),接近空白组;添加益生菌组的相对表达量与空白组相当。与空白组相比,攻毒组的 Claudin-1 相对 mRNA 表达量极显著下调 ($P<0.01$),而解毒组与攻毒组相比相对表达量极显著上调 ($P<0.01$)。结果说明,发霉饲料引起空肠组织上皮细胞紧密连接损伤,而添加 2 株益生菌后,显著缓解了霉菌毒素对空肠组织上皮细胞紧密连接损伤。

2.6 益生菌联合使用对肉鸡空肠炎症因子 mRNA 表达水平的影响

如图 6 所示,与空白组相比,食用发霉饲料的攻毒组肉鸡空肠炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α



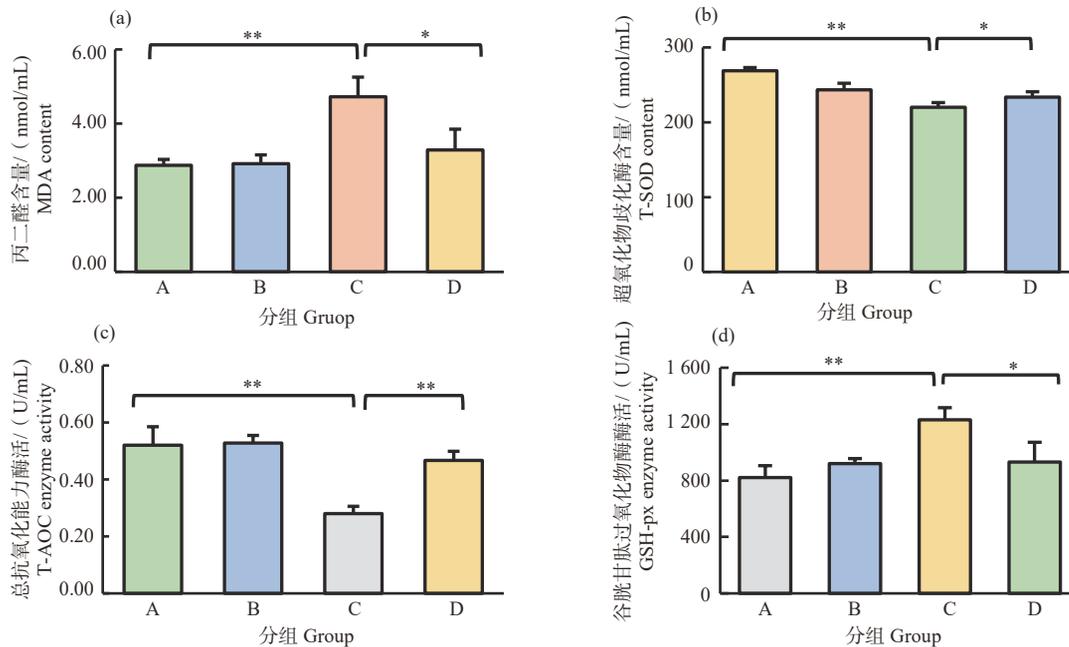
(a)不同分组绒毛长度;(b)不同分组隐窝深度。

(a) Villus lengths of different groups; (b) Crypt depth of different groups.

A:空白组;B:益生菌组;C:攻毒组;D:解毒组。*表示与显著差异($P<0.05$),**表示显著极差异($P<0.01$)。下同。A: Blank group; B: Micro-ecological preparation control group; C: Attack group; and D: Detoxification group. *indicates difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

图2 益生菌联合使用对食用发霉饲料肉鸡空肠绒毛长度和隐窝深度的影响

Fig. 2 Effect of combination use of probiotic on the length and crypt depth of jejunal villi in broiler chickens fed with moldy feed



(a)丙二醛含量;(b)超氧化物歧化酶含量;(c)总抗氧化能力酶活;(d)谷胱甘肽过氧化物酶活。

(a) MDA content; (b) T-SOD content; (c) T-AOC enzyme activity; (d) GSH-px enzyme activity.

图3 益生菌联合使用对食用发霉饲料肉鸡血清生化指标的影响

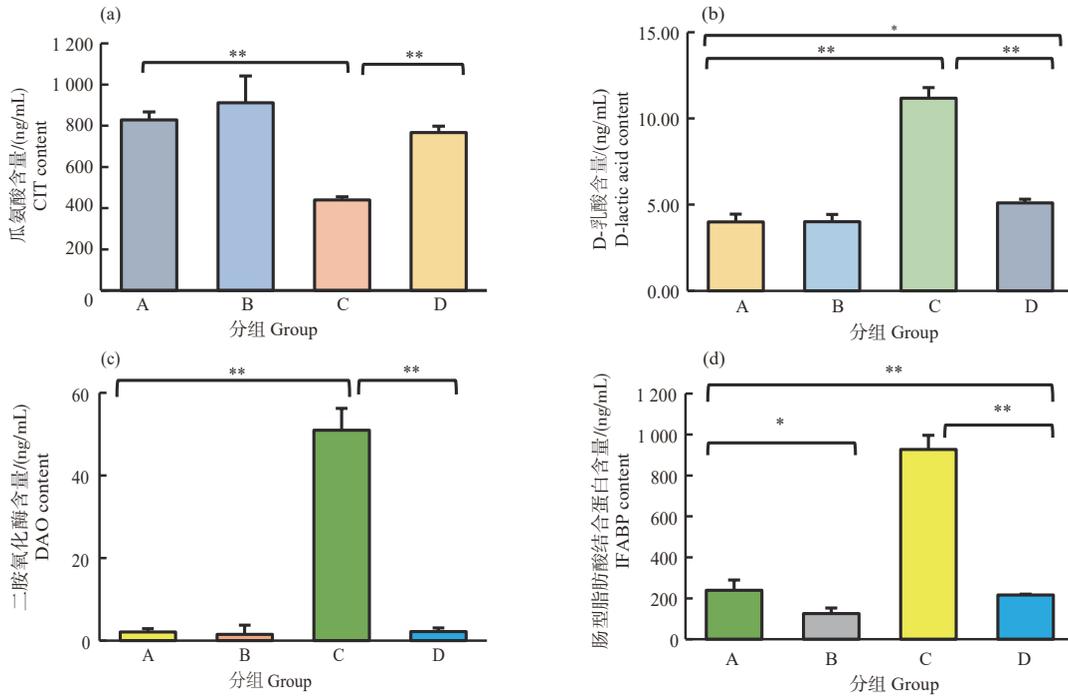
Fig. 3 Effect of combination use of probiotic on serum biochemical indicators of broiler chickens fed moldy feed

的 mRNA 表达水平均发生极显著升高($P<0.01$)。此外,与攻毒组相比,解毒组的炎症因子 $IL-6$ 、 $IL-8$ 和 $TNF-\alpha$ 的 mRNA 表达水平均发生极显著回调($P<0.01$),炎症因子 $IL-1\beta$ 的 mRNA 表达水平发生显著回调($P<0.05$),接近空白组水平。由此可见,2株益生菌联合使用可抑制肉鸡食用发霉饲料引起的空肠炎症反应。

3 讨论

3.1 益生菌联合使用对食用发霉饲料肉鸡生产性能的影响

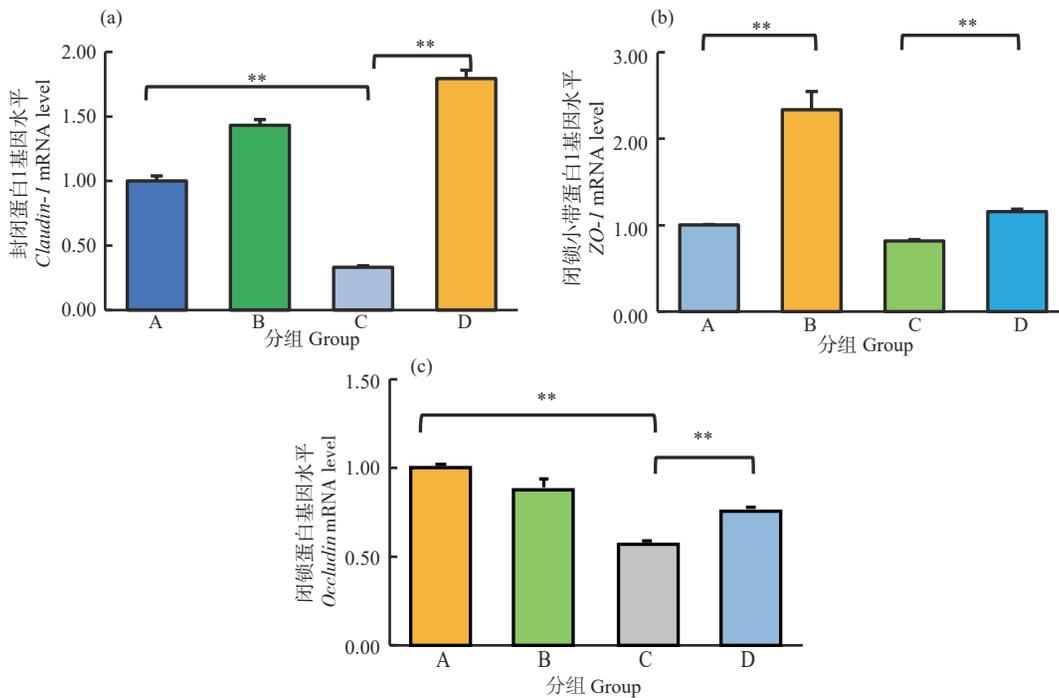
目前,饲料中霉菌毒素污染现象非常普遍,但霉菌毒素在饲料中并不是单独存在,而是多种并存,危害要比单一毒素更为严重^[10]。因此,使用多



(a)瓜氨酸含量;(b)D-乳酸含量;(c)二胺氧化酶含量;(d)肠型脂肪酸结合蛋白含量。
 (a) CIT content; (b) D-lactic acid content; (c) Content of DAO; (d) Content of IFABP.

图 4 益生菌联合使用对食用发霉饲料肉鸡空肠屏障指标的影响

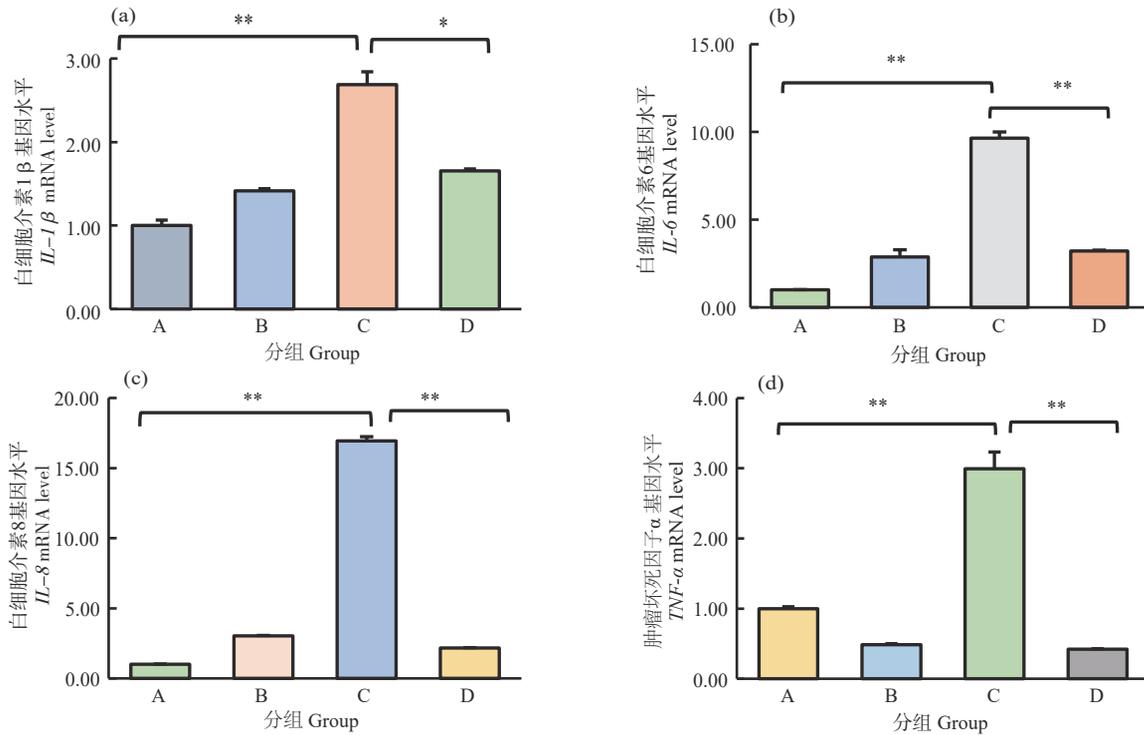
Fig. 4 Effect of probiotics on intestinal barrier indexes of jejunum of broilers fed with moldy feed



(a)封闭蛋白1基因水平;(b)封锁小带蛋白1基因水平;(c)闭锁蛋白基因水平。
 (a) Level of *Claudin-1* gene; (b) Level of *ZO-1* gene; (c) Different levels of *Occludin* genes.

图 5 肉鸡空肠组织紧密连接蛋白 mRNA 表达水平

Fig. 5 Expression level of tight junction protein mRNA in broiler jejunum



(a) 白细胞介素1 β 基因水平; (b) 白细胞介素6基因水平; (c) 白细胞介素8基因水平; (d) 肿瘤坏死因子 α 基因水平。

(a) *IL-1 β* gene level; (b) *IL-6* gene level; (c) *IL-8* gene level; (d) *TNF- α* gene level.

图6 肉鸡空肠组织炎症因子mRNA表达水平

Fig. 6 Expression level of inflammatory factor mRNA in broiler jejunum

种毒素共同污染的饲料作为研究更为切合实际。本研究使用发霉饲料中含有的3种毒素, AFB1, OTA和ZEA是饲料中最为常见的霉菌毒素^[11]。研究表明, 多种霉菌毒素同时存在可降低动物的生长性能, 对畜禽脏器造成严重损伤^[12]。本研究表明, 这3种毒素的存在可严重影响肉鸡的生产性能, 对肠道造成严重损伤, 这与前人研究结果一致^[13-14]。研究表明, 霉菌毒素 AFB1和ZEA联合使用, 降低了肉鸡生产性能, 但饲料中同时添加枯草芽孢杆菌、干酪乳杆菌和假丝酵母菌提高了肉鸡采食量, 提高了肉鸡生产性能^[15]。研究发现, AFB1降低了肉鸡生产性能和血清生化指标, 而饲喂唾液乳杆菌不仅仅能够改善肉鸡健康, 提高生产性能, 还能消除AFB1的毒性作用^[16]。本研究结果表明, 饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌后, 也显著提高了由于霉菌毒素对肉鸡造成的生产性能下降。这进一步证明, 饲料中添加益生菌可以拮抗霉菌毒素造成的肉鸡生产性能下降。

3.2 益生菌联合使用对食用发霉饲料肉鸡肠道屏障损伤的影响

DAO、IFABP、D-乳酸和瓜氨酸都可以作为肠道屏障障碍的预警指标^[17]。当肠粘膜屏障受损时, 血清DAO、IFABP和D-乳酸水平会升高^[17]。本研究结果显示, 与空白组相比, 肉鸡食用被霉菌毒素污染的饲料后, 其血浆中DAO、D-乳酸和IFABP的含量明显升高, CIT的含量明显降低说明了霉菌毒素对肉鸡肠道屏障造成损伤。研究表明, AFB1可升高肉鸡血浆中DAO的水平^[18], 镰刀菌霉菌毒素会造成仔猪血浆中DAO和D-乳酸的含量升高^[19]。有研究表明, 山羊暴露于AFB1后会引引起代谢途径的内源性的代谢变化, 其中血清中瓜氨酸的含量降低^[20]。同样, 本研究中攻毒组DAO、IFABP和D-乳酸指标的上升, CIT的含量降低, 说明AFB1、OTA和ZEA可造成肉鸡肠道通透性增加, 使DAO、IFABP和D-乳酸释放入血, 说明了霉菌毒素对肉鸡肠道屏障造成损伤。但经过益生菌干预

后,血浆内DAO、IFABP和D-乳酸水平显著下降,CIT的含量上升,说明益生菌对霉菌毒素肠道粘膜屏障损伤的起到了保护作用。

肠道机械屏障由肠道黏液层、肠上皮细胞以及细胞间紧密连接和黏膜下固有层与菌膜三者构成。其中肠上皮细胞的屏障功能由细胞间紧密连接的通透性所决定^[21]。肠道上皮细胞的紧密连接由几种跨膜和胞质蛋白组成,主要包括Occludin、ZO-1和Claudin-1 3种蛋白。霉菌毒素可通过改变肠道紧密连接蛋白的表达水平导致肠道机械屏障功能受损^[22]。研究发现,AFB1可降低Claudin-1和ZO-1蛋白表达^[23],OTA能够降低小鼠盲肠的紧密连接蛋白Claudin-1、ZO-1和Occludin的表达水平^[24]。本研究结果表明,肉鸡食用被多种霉菌毒素污染的饲料后,*Occludin*、*ZO-1*和*Claudin-1*的mRNA表达量显著降低,说明饲料中含有AFB1、OTA和ZEA造成了肉鸡空肠机械屏障损伤。而通过饲喂益生菌后,与攻毒组相比,3种紧密连接蛋白的mRNA表达量显著上升,说明益生菌能够缓解由霉菌毒素造成的肠道紧密连接损伤,降低了霉菌毒素对肠道机械屏障损伤。

3.3 益生菌联合使用拮抗发霉饲料引起肉鸡生产性能下降和肠道损伤作用机制探讨

研究表明,许多益生菌株的使用可以降低霉菌毒素对畜禽的危害。本研究所使用的两株益生菌一株是贝莱斯芽孢杆菌A2,该菌株已被证明具有降解玉米赤霉烯酮作用,能够缓解玉米赤霉烯酮对小鼠肾脏的毒性作用^[7],另外一株是戊糖片球菌xy46,该菌株也被证明对玉米赤霉烯酮引起的小鼠生殖系统毒性有很好的拮抗作用^[9]。通过本研究证明,这两株菌联合使用有效的拮抗了发霉饲料引起的肉鸡生产性能下降和肠道损伤。这可能由于贝莱斯芽孢杆菌A2能够降解这3种霉菌毒素,戊糖片球菌xy46能够吸附这3种毒素,进而降低了霉菌毒素的浓度进而减轻对肠道的损伤。此外,贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌均能够提高机体的抗氧化能力,提高肠道抗氧化能力,提高肠道上皮细胞活力^[25-26],进而降低霉菌毒素对肠道的氧化损伤。贝莱斯芽孢杆菌提高机体的抗氧化能力可能与其产生的胞外多糖有关^[27],还与其能够通过分泌抗菌肽调控细胞

Nrf2信号通路有关^[28],而戊糖片球菌可以通过其细胞表面的多糖或者磷壁酸等能够清除机体细胞的自由基,进而防止机体细胞过氧化^[29],还可以通过调控Nrf2-Keap1抗氧化信号通路^[30]起到抗氧化作用。另外一个重要原因,贝莱斯芽孢杆菌和戊糖片球菌调控了肠道菌群^[31-32],增加了肠道益生菌的种类和数量,进而起到降低霉菌毒素对肠道的氧化损伤和炎症反应。因此,本研究尚有不足之处,未能测定肠道菌群的变化情况。同时,接下来可以通过细胞试验来揭示这两株菌提高肠道上皮细胞抗氧化能力的分子机制,降低霉菌毒素对肠上皮细胞损伤的分子机制。

4 结 论

贝莱斯芽孢杆菌A2和戊糖片球菌xy46联合使用能拮抗发霉饲料造成肉鸡肠道屏障损伤,并且减轻由霉菌毒素造成的肠道炎症反应,改善因霉菌变饲料所导致的肉鸡生产性能下降。

本研究为利用贝莱斯芽孢杆菌A2和戊糖片球菌xy46作为饲料添加剂防控霉菌毒素中毒奠定基础。

参考文献 References

- [1] Abdelhamid A G, El-Desy S S, El-Dougoug N K. Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains possess safety characteristics, antiviral activities and host adherence factors revealed by genome mining [J]. *EPMA Journal*, 2019, 10(4): 337-350
- [2] Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health [J]. *Nutrients*. 2017, 9(9):1021
- [3] 关心,何剑斌,董双,臧健,龙森. 黄曲霉毒素B1高效降解菌株的筛选鉴定及其降解[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2):90-96
Guan X, He J B, Dong S, Zang J, Long M. Isolation, identification and preliminary degradation of aflatoxin B1 degrading bacterial strain [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(2): 90-96 (in Chinese)
- [4] 吴宗芮,丁轲,余祖华,李旺,李元晓,曹平华,何万领,贾艳艳,刘宁. 降解玉米赤霉烯酮菌株的筛选、降解机制及特性研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(9):27-33
Wu Z R, Ding K, Yu Z H, Li W, Li Y X, Cao P H, He W L, Jia Y Y, Liu N. Screening, degradation mechanism and characteristics of strains degrading Zearalenone [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2022, 37(9):27-33 (in Chinese)
- [5] Garcia G R, Payros D, Pinton P, Dogi C A, Laffitte J, Neves M, Pereyra M L G, Cavaglieri L R, Oswald I P. Intestinal toxicity of

- deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants[J]. *Archives of Toxicology*, 2018,92(2): 983-993
- [6] Qing H R, Huo X T, Huang S M, Zhao L H, Zhang J Y, Ji C, Ma Q G. *Bacillus subtilis* ANSB168 producing d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase could alleviate the immune injury and inflammation induced by Ochratoxin A[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21):12059
- [7] Wang N, Li P, Wang M Y, Chen S, Huang S, Long M, Yang S H, He J B. The protective role of *Bacillus velezensis* A2 on the biochemical and hepatic toxicity of Zearalenone in mice[J]. *Toxins*, 2018,10(11):449
- [8] Wang N, Li P, Pan J W, Wang M Y, Long M, Zang J, Yang S H. *Bacillus velezensis* A2 fermentation exerts a protective effect on renal injury induced by Zearalenone in mice[J]. *Scientific Reports*, 2018,8(1): 13646
- [9] Yang S H, Gong P, Pan J W, Wang N, Tong J J, Wang M Y, Long M, Li P, He J B. *Pediococcus pentosaceus* xy46 can absorb zearalenone and alleviate its toxicity to the reproductive systems of male mice [J]. *Microorganisms*, 2019,7(8):266
- [10] Yang C, Song G, Lim W. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 389:122087
- [11] Huang S, Zheng N, Fan C Y, Cheng M, Wang S, Jabar A, Wang J Q, Cheng J B. Effects of aflatoxin B1 combined with ochratoxin A and/or zearalenone on metabolism, immune function, and antioxidant status in lactating dairy goats[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(4):505-513
- [12] Sun Y H, Huang K H, Long M, Yang S H, Zhang Y. An update on immunotoxicity and mechanisms of action of six environmental mycotoxins[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 163:112895
- [13] Sobral M M C, Faria M A, Cunha S C, Ferreira I M P L V O. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells[J]. *Chemosphere*, 2018, 202:538-548
- [14] Huang W W, Chang J, Wang P, Liu C Q, Yin Q Q, Song A D, Gao T Z, Dang X W, Lu F S. Effect of compound probiotics and mycotoxin degradation enzymes on alleviating cytotoxicity of swine jejunal epithelial cells induced by aflatoxin B₁ and zearalenone[J]. *Toxins*, 2019, 11(1):12
- [15] Chang J, Wang T, Wang P, Yin Q Q, Liu C Q, Zhu Q, Lu F S, Gao T Z. Compound probiotics alleviating aflatoxin B₁ and Zearalenone toxic effects on broiler production performance and gut microbiota [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 194:110420
- [16] Yasmeen R, Zahid B, Alyas S, Akhtar R, Zahra N, Kouser S, Hashmi A S, Athar M, Tayyab M, Anjum A A. Ameliorative effects of *Lactobacillus* against Aflatoxin B1 [J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 84:e250517
- [17] Chen C J, Lin Z Q, Zhang X X, Zhang X Y, Cheng Z X, Jin T, Liu T T, Deng L H, Guo J, Wang G Z, Xia Q. Extracellular histones cause intestinal epithelium injury and disrupt its barrier function in vitro and in vivo[J]. *Toxicology*, 2022, 469:153117
- [18] Liu N, Wang J Q, Jia S C, Chen Y K, Wang J P. Effect of yeast cell wall on the growth performance and gut health of broilers challenged with aflatoxin B1 and necrotic enteritis [J]. *Poultry Science*, 2018, 97(2): 477-484
- [19] Ji X, Zhang Q, Zheng W J, Yao W. Morphological and molecular response of small intestine to lactulose and hydrogen-rich water in female piglets fed *Fusarium* mycotoxins contaminated diet [J]. *J Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2019, 10: 9
- [20] Cheng J B, Huang S A, Fan C Y, Zheng N, Zhang Y D, Li S L, Wang J Q. Metabolomic analysis of alterations in lipid oxidation, carbohydrate and amino acid metabolism in dairy goats caused by exposure to Aflatoxin B1[J]. *Journal of Dairy Research*, 2017, 84(4): 401-406
- [21] 刘红宾,田祥宇,王忠. 肠道黏膜紧密连接与通透性研究进展[J]. 饲料研究,2015,2:18-23
- Liu H B, Tian X Y, Wang Z. Research progress on tight junction and permeability of intestinal mucosa[J]. *Feed Research*, 2015, 2: 18-23 (in Chinese)
- [22] 杨雪,高亚男,王加启,郑楠. 霉菌毒素对肠道紧密连接蛋白的影响及其调控机制[J]. 动物营养学报,2020,32(12):5566-5577
- Yang X, Gao Y N, Wang J Q, Zheng N. Effects of mycotoxin on intestinal tight junction protein and its regulation mechanism [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020,32(12):5566-5577 (in Chinese)
- [23] Wang X H, Yang F Y, Na L F, Jia M, Ishfaq M, Zhang Y F, Liu M C, Wu C D. Ferulic acid alleviates AFB1-induced duodenal barrier damage in rats via up-regulating tight junction proteins, down-regulating ROCK, competing CYP450 enzyme and activating GST [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 241: 113805
- [24] Du G G, Chang S D, Guo Q, Yan X H, Chen H, Shi K, Yuan Y H, Yue T L. Protective effects of Tibetan kefir in mice with ochratoxin A-induced cecal injury [J]. *Food Research International*, 2022, 158: 111551
- [25] Hao L H, Cheng Y Z, Su W F, Wang C, Lu Z Q, Jin M L, Wang F Q, Wang Y Z. *Pediococcus pentosaceus* ZJUAF-4 relieves oxidative stress and restores the gut microbiota in diquat-induced intestinal injury [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(4):1657-1668
- [26] Xie Y, Chupina Estrada A, Nelson B, Feng H P, Pothoulakis C, Chesnel L, Koon H W. ADS024, a *Bacillus velezensis* strain, protects human colonic epithelial cells against *C difficile* toxin-mediated apoptosis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13:1072534
- [27] Cao C X, Liu Y M, Li Y, Zhang Y, Zhao Y, Wu R N, Wu J R. Structural characterization and antioxidant potential of a novel exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 from spontaneously fermented Da-Jiang[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2020, 37(3):307-317
- [28] Khan M M, Kim Y K, Bilkis T, Suh J W, Lee D Y, Yoo J C. Reduction of oxidative stress through activating the Nrf2 mediated HO-1 antioxidant efficacy signaling pathway by MS15, an antimicrobial peptide from *Bacillus velezensis*[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(10):934
- [29] Yang S J, Kim K T, Kim T Y, Paik H D. Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju[J]. *Foods*, 2020, 9(9):1154
- [30] Wang L L, Liu Q H, Chen Y W, Zheng X L, Wang C N, Qi Y N, Dong Y C, Xiao Y, Chen C, Chen T H, Huang Q Y, Zhai Z Z, Long C M, Yang H S, Li J Z, Wang L, Zhang G H, Liao P, Liu Y X, Huang P, Huang J L, Wang Q Y, Chu H H, Yin J, Yin Y L. Antioxidant potential

- of *Pediococcus pentosaceus* strains from the sow milk bacterial collection in weaned piglets[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1):83
- [31] Khalid F, Khalid A, Fu Y C, Hu Q, Zheng Y F, Khan S, Wang Z G. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: A review[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(7):627-633
- [32] Pan S P, Wei H M, Yuan S S, Kong Y, Yang H Q, Zhang Y H, Cui X R, Chen W A, Liu J M, Zhang Y. Probiotic *Pediococcus pentosaceus* ameliorates MPTP-induced oxidative stress via regulating the gut microbiota-gut-brain axis [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12:1022879

责任编辑:秦梅



第一作者简介: 李佳暉,沈阳农业大学在读硕士研究生,动物医学临床兽医学专业。本科就读于吉林农业科技学院动物医学专业。在业余时间,我喜欢阅读和运动。阅读可以让我学习到更多的知识,开阔视野,而运动则让我保持健康的身体和愉快的心情。我喜欢看一些关于动物和人类健康的书籍,这让我更加深入地了解动物医学领域的知识。此外,我还喜欢听音乐和旅游,音乐可以让我身心放松,旅游则可以让我领略到不同地域的风土人情和文化魅力。



通讯作者简介: 龙森,博士,沈阳农业大学动物科学与医学学院教授、博士生导师。中国畜牧兽医学学会兽医内科与临床诊疗学分会常务理事,动物毒物学分会常务理事。研究方向为畜禽临床疾病防治,主要聚焦畜禽霉菌毒素中毒机制以及防控措施等方面研究。主持多项国家自然科学基金5项,及省部级科研项目10余项,在 *Food and Chemical Toxicology*, *Toxins* 和 *Microorganisms* 国内外期刊发表论文60余篇。