

玉米赤霉烯酮降解菌的分离鉴定、益生特性及其对中毒小鼠的缓解作用研究

张启航¹, 吴慧昊², 陈文燕¹, 周 瑞^{1,3}, 李耀东¹, 臧荣鑫^{1*}, 徐红伟^{1*}

(1. 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730100; 2. 西北民族大学实验教学部, 甘肃兰州 730100;

3. 西北民族大学生物技术与生物工程国家民委重点实验室, 甘肃兰州 730030)

摘要: 本研究旨在分离筛选出具有体外降解玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN), 且具备良好益生性的枯草芽孢杆菌, 并评估其缓解小鼠 ZEN 中毒症状的能力, 为其作为饲料添加剂和霉菌毒素脱毒菌剂提供参考依据。从牡丹根际土壤样品中, 分离纯化对 ZEN 具有降解能力的益生菌并探究菌株益生性能。将 30 只雌鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 每组平均体重 25~28 g, 对照组小鼠灌服生理盐水, ZEN 组灌服 ZEN 标准品稀释液(50 mg/kg BW), H-1 组灌服 ZEN 标准品稀释液(50 mg/kg BW)与 H-1 培养液(1×10^8 CFU/mL), 每只小鼠灌服剂量为 0.2 mL, 检测各组生长性能、脏器指标和肝脏与生殖系统相关指标。结果表明: 枯草芽孢杆菌 H-1 玉米赤霉烯酮体外降解率可达 88.3%, 并且有较好的益生性与安全性。与 ZEN 组相比, H-1 菌株对 ZEN 造成的生长性能影响有改善作用($P < 0.05$); 同时, 与 ZEN 组相比, H-1 组子宫卵巢系数降低($P < 0.05$), 促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)含量升高($P > 0.05$), 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平降低($P < 0.05$)。分离所得枯草芽孢杆菌 H-1 具有体外降解玉米赤霉烯酮的能力与良好的益生性能, 可缓解玉米赤霉烯酮中毒对小鼠肝脏及生殖系统造成的损伤。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 分离鉴定; 益生性; 玉米赤霉烯酮

中图分类号: S865.1⁺30.4

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250120-04

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是一种广泛存在于谷物和饲料产品中的霉菌毒素, 对人类和动物健康构成威胁^[1]。ZEN 主要损害动物的肝脏等器官, 并可通过与 17 β -雌二醇竞争性结合雌激素受体, 干扰内分泌系统, 进而诱发家畜和家禽的生殖功能障碍^[2-3]。我国饲料原料霉菌毒素污染情况调查显示, ZEN 污染率高达 82.2%^[4], 表明其污染问题已十分严峻。因此, 加强饲料原料中 ZEN 的防控与治理, 已成为保障畜牧业健康可持续发展的迫切需求。ZEN 传统的脱毒方法

有物理法与化学法 2 种^[5-6], 但物理法脱毒常用的吸附剂同时会结合维生素以及微量元素, 造成营养成分流失, 而化学法脱毒后饲料中的部分营养物质可能会因化学试剂的加入而受到破坏, 2 种方法都存在一定局限性^[7-8]。相比之下, 微生物降解法具有降解效率高, 环境危害小, 饲料产品的质量降低少等优点, 迅速成为国内外研究热点^[9]。文钧等^[10]筛选出 1 株具有体外降解 ZEN 功能的蔬菜芽孢杆菌, 其降解率可达 85.4%。同时, 部分微生物还被证实可通过调节宿主免疫、抗氧化或肠道屏障保护等机制, 缓解 ZEN 诱导的多器官损伤^[11-12]。然而, 目前微生物降解 ZEN 的研究集中在体外降解和缓解 ZEN 中毒损伤方面, 同时具有体外降解 ZEN 能力和缓解 ZEN 中毒损伤的益生菌鲜见报道。基于此, 本研究拟分离筛选出具有体外降解 ZEN 能力且具备良好益生性的枯草芽孢杆菌, 并评估其缓解小鼠 ZEN 中毒症状的能力, 为将来其作为饲料添加剂和霉菌毒素脱毒菌剂提供参

收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-02-23

资助项目: 甘肃省科技计划项目(24ZDNA004、24YFWA016); 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金(31920210060、31920210004)

作者简介: 张启航(1999-), 男, 山东济南人, 硕士, 主要从事肠道菌群与健康研究, E-mail: 1614427745@qq.com

*通信作者: 臧荣鑫(1968-), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为生物发酵饲料研究, E-mail: rxzang2000@163.com; 徐红伟(1983-), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为畜产品加工, E-mail: xuhognwei@xbmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 采自榆中校区牡丹根际土壤，无菌管封存，-20℃冰箱冻存备用。

1.1.2 试验动物 4 周龄雌性 C57BL/6 小鼠，购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

1.1.3 主要试剂 琼脂粉、牛肉浸粉、酵母粉、蛋白胨、胰蛋白胨、牛胆盐、胃蛋白酶、胰蛋白酶（大连美仑生物技术有限公司），甲醇中玉米赤霉烯酮标准品溶液（山东美正生物科技有限公司），玉米赤霉烯酮标准品（四川精萃天成药物科技有限公司），乙腈（天津市恒兴化学试剂制造有限公司），细菌微量生化反应管（杭州微生物试剂有限公司），药物敏感纸片（湖南比克曼生物科技有限公司），革兰氏染液（北京索莱宝科技有限公司），玉米赤霉烯酮（ZEN）、促卵泡生成素（FSH）、促黄体生成素（LH）、雌二醇（E₂）Elish 检测试剂盒（天津龙科新域生物技术有限公司），谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）试剂盒（南京建成科技有限公司）。1.1.4 培养基 试验所需肉汤培养基、LB 培养基等参照微生物学实验^[13]配置。人工胃液、人工肠液参照文献^[14]进行配制。

1.1.5 仪器与设备 光学显微镜（13395H2X，上海徕卡显微系统有限公司），恒温振荡器（THZ-98AB，上海一恒科学仪器有限公司），电子天平（PTX-FA210，福建华志电子科技公司），高速离心机（LG20-W，北京京立离心机有限公司），酶标仪（HBS-1096A，南京德铁实验设备有限公司），紫外分光光度计（UV-6000，上海元析仪器有限公司），立式压力蒸汽灭菌器（YXQ-LB-75S1，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）。

1.2 菌株的分离与筛选 称取 1 g 土壤样品，置于 50 mL 肉汤培养基中，80℃水浴处理 15 min，后于 37℃恒温振荡培养 24 h。取培养菌液 1 mL，用无菌生理盐水进行梯度稀释，吸取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 各梯度处理液 100 μL 涂布平板，37℃恒温培养 24 h，根据菌落形态挑取单菌落镜检，选取产芽孢杆菌划线分离纯化，将纯化后芽孢杆菌在 4℃冷藏保存。

参照刘晨^[15]方法，各菌株活化培养后接种于肉汤培养基中，37℃培养 24 h，将甲醇中玉米赤霉烯酮

标准品溶液稀释备用。菌株培养结束后，取 900 μL 各菌株发酵液与 100 μL 玉米赤霉烯酮标准品稀释液，于 1.5 mL 无菌离心管中混合，作为实验组。取 900 μL 肉汤培养基与 100 μL 玉米赤霉烯酮标准品稀释液，于 1.5 mL 无菌离心管中混合，作为对照组。实验组与对照组 37℃培养 72 h 后检测各菌株的 ZEN 降解率，以 ZEN 体外脱毒率为标准，选取降解率最高的菌株进行后续试验。菌株 ZEN 降解率使用下式计算：

菌株霉菌毒素降解率 = (1 - 实验组毒素浓度 / 对照组毒素浓度) × 100%

1.3 菌株生理生化鉴定 对菌株进行糖发酵试验、V-P 试验和明胶液化等试验，参照《伯杰细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》对菌株进行初步鉴定。

1.4 分子鉴定 扩增菌株 16S rDNA 基因片段。扩增通用引物 27F 5'-AGAGTTTGA-TCCTGGCTCAG-3' 和 1492R 5'-GGTTACCTTGTTA-CGACTT-3'，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。扩增体系：Premix Taq 12.5 μL，上、下游引物各 1 μL，基因组 DNA 1 μL，ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增程序：94℃预变性 4 min；94℃变性 45 s，55℃退火 45 s，72℃延伸 60 s，共 30 个循环；72℃再延伸 10 min；4℃保存。用琼脂糖凝胶电泳检测并回收目标产物，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对，并采用 MEGA11.0 软件构建系统发育进化树。

1.5 产酶试验 参照赵斌等^[16]方法，在无菌条件下，使用接种环挑取枯草芽孢杆菌，分别点种于纤维素酶选择培养基、蛋白酶选择培养基与淀粉酶选择培养基上，37℃培养 48 h。直接观察蛋白酶选择培养基菌落周围透明圈情况，纤维素酶选择培养基使用 1 mg/mL 刚果红染色后用 1 mol/L NaCl 溶液洗脱至出现透明圈，淀粉酶选择培养基加碘液显色后观察菌落周围透明圈情况。

1.6 胆盐耐受试验 参照 Guo 等方法^[17]，取 100 μL 菌液分别加入 900 μL 的 0.1%、0.2%、0.3% 浓度人工胆盐混匀，作为实验组。取 100 μL 菌液加入 900 μL 生理盐水混匀，作为对照组。将实验组与对照组同时置于 37℃、200 rpm 下培养 2 h，取出后进行梯度稀释涂平板，于 37℃培养 24 h，选取菌落数在 30~300 的平板进行计数，重复 3 次试验。

胆盐耐受率 = 实验组菌落数 / 对照组菌落数 × 100%

1.7 人工肠液与人工胃液耐受试验 参照于秀菊等方

法^[18]，取 100 μL 菌液加入 900 μL 人工肠液（人工胃液）中混匀，置于 37℃、200 rpm 下培养 0、1、2、3、4、5、6 h，培养完成后，进行梯度稀释涂平板，于 37℃ 培养 24 h，选取菌落数在 30~300 的平板进行计数，重复 3 次试验。以 0 h 的活菌数作对照组，计算不同处理时间的存活率。

人工肠液（人工胃液）耐受率 = （不同处理时间菌落数 / 0 h 菌落数）× 100%

1.8 细胞自动聚集能力与细胞表面疏水性 参照 Jeon 方法^[19]，将菌悬液浓度调整至 OD₆₀₀ 为 0.5。吸取 5 mL 悬浮液置于离心管中，37℃ 孵育 4 h，吸取上部悬浮液，测定 OD 值。

自动聚集百分比 = （1-4 h 后菌悬液上层悬浮液 OD 值 / 菌悬液初始 OD 值）× 100%

参照 Pelka 等方法^[20]，将菌株活化培养后接种于肉汤培养基中，37℃ 培养 24 h，培养液 4000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液，菌体使用去离子水洗涤并重悬，使菌悬液浓度在 600 nm 下的吸光度达到 0.1~0.2。吸取 3 mL 菌悬液与 1 mL 二甲苯混合，37℃ 下孵育 1 h。待水相和有机相分离后吸取 1 mL 水相，600 nm 处测量吸光度。

黏附能力 = （1-1 h 后水相的吸光度 / 0 h 时水相的吸光度）× 100%

1.9 DPPH 自由基清除能力测定 参照刘洋等^[21]的方法，将菌株活化培养后接种于肉汤培养基中，37℃ 培养 24 h，培养液 4 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液，菌体经去离子水 2 次洗涤后再将菌体细胞重悬，制成菌悬液。取菌悬液 1 mL，加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 2 mL、混匀后在室温下避光反应 30 min，6 000 r/min 离心 10 min，取上清液在 517 nm 下测定吸光度。等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液作空白组，等体积蒸馏水代替样品溶液作对照组，等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零。使用下式计算：

清除率 = [1 - （样品组 OD 值 - 空白组 OD 值） / 对照组 OD 值] × 100%

1.10 耐药性试验 采用纸片扩散法检测解枯草芽孢杆菌对氯霉素、青霉素、利福平、红霉素、链霉素、四环

素、环丙沙星、氧氟沙星等 10 种抗生素的耐药性。

1.11 溶血性试验 无菌条件下，使用接种环挑取枯草芽孢杆菌单菌落，划线接种和点种于哥伦比亚血平板上，37℃ 恒温培养 24 h，观察菌落周围是否产生溶血环。

1.12 菌株对 ZEN 中毒小鼠的影响 本试验经西北民族大学实验动物伦理委员会批准（批准号 xbmusm-202448）。将 ZEN 标准品溶解于乙腈溶液中，制成 ZEN 标准品稀释液，于 -20℃ 冰箱中避光保存。30 只小鼠在适应性饲养 7 d 后，随机分为 3 组，平均体重 25~28 g，对照组小鼠饲喂基础饲料并灌服生理盐水，ZEN 组小鼠在基础饲料的基础上灌服 ZEN 标准品稀释液（50 mg/kg BW），H-1 组小鼠在基础饲料的基础上灌服 ZEN 标准品稀释液（50 mg/kg BW）与 H-1 培养液（1×10⁸ CFU/mL），每只小鼠灌服剂量为 0.2 mL，试验期 14 d。试验期间自由采食和饮水，观察并记录小鼠体重变化、精神状态、生长状况。试验结束，收集血液，分离血清，采用 ELISA 试剂盒测定血清中雌二醇（E₂）浓度、促卵泡素（FSH）和黄体生成素（LH）活性，并测定血清中 ALT 与 AST 活力。采集肝脏、脾脏、胸腺、子宫卵巢并计算器官系数。器官系数 = （器官重量 / 小鼠体重）× 100%。

1.13 统计与分析 试验数据采用 SPSS 21.0 进行 t 检验，origin2021 作图，数据结果表示为平均值 ± 标准差。P<0.05 表示差异显著，P≥0.05 表示差异不显著。

2 结果

2.1 各菌株 ZEN 降解率测定 由表 1 可知，菌株 H-1 的 ZEN 降解率最高，可达 88.30%，具有较高降解 ZEN 的能力。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌株生理生化鉴定 如表 2 所示，菌株 H-1 的生化鉴定结果为 V-P、木糖、蔗糖、阿拉伯糖、麦芽糖、葡萄糖、明胶液化试验结果呈现为阳性，乳糖、甘露醇、硫化氢试验结果呈现为阴性，将试验结果与《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对照，初步判断分离所得菌株属于芽孢杆菌属。

2.2.2 16S rDNA 基因序列分析 菌株 16S rDNA 基因扩

表 1 各菌株 ZEN 降解率

指标	L-1	L-2	H-1	H-2	Z-1	Z-2	X-1	X-2
ZEN 降解率,%	58.44±4.17	20.12±1.43	88.30±3.42	60.33±3.66	30.43±2.18	73.75±5.43	50.16±6.72	45.57±3.43

表 2 菌株生化鉴定结果

项目	鉴定结果
V-P 试验	+
乳糖 Lactose	-
木糖 Xylose	+
蔗糖 Fructose	+
阿拉伯糖 Arabinose	+
麦芽糖 Maltose	+
葡萄糖 Glucose	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
甘露醇 Mannitol	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应。

增产物片段大小在 1 500 bp 左右（图 1），将菌株序列在 NCBI 数据库中进行比对，采用 MEGA 软件构建系统发育进化树。分离所得菌株与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）DSM10 相似性为 99.86%，结合菌株的形态学特征以及生理生化试验结果，确定该菌株为枯草芽孢杆菌，并命名为枯草芽孢杆菌 H-1（*Bacillus subtilis* H-1），提交中国典型培养物保藏中心保藏（保藏编号：CCTCC NO:M 2024944）。

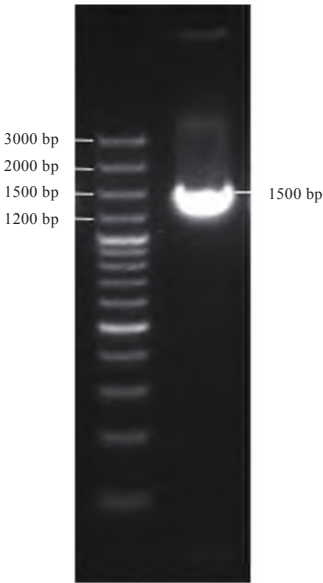


图 1 分离菌株 16S rDNA 基因序列鉴定结果

2.3 菌株益生性能研究

2.3.1 产酶试验 枯草芽孢杆菌 H-1 可产淀粉酶与纤维素酶，且产酶能力良好，菌株不产蛋白酶（图 3）。

2.3.2 胆盐耐受试验 由表 3 可知，分离所得菌株在 0.3% 浓度的胆盐条件下培养 4 h 后仍有 70% 以上的存活率，

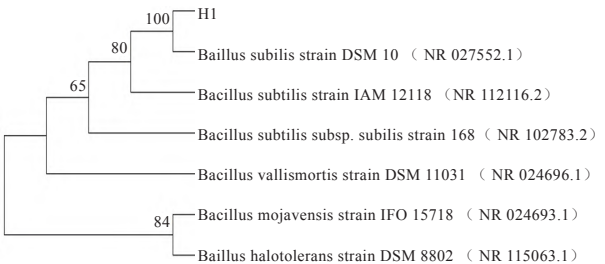
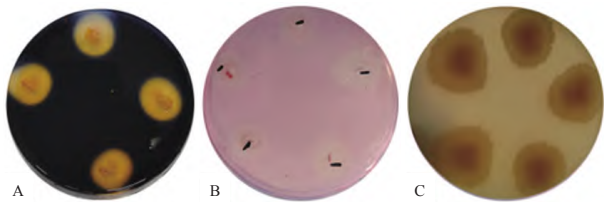


图 2 分离菌株 16S rDNA 序列系统进化树



A: 淀粉酶；B: 纤维素酶；C: 蛋白酶。

图 3 菌株产酶情况

表 3 菌株胆盐耐受能力

指标	0.1% 胆盐	0.2% 胆盐	0.3% 胆盐
菌株存活率,%	91.7±0.95	87.27±0.85	72.37±1.21

说明菌株有较好的胆盐耐受能力。

2.3.3 人工肠液与人工胃液耐受试验 如表 4 所示，分离所得菌株在人工胃液中处理 6 h 后存活率能达到 45.5%，在人工肠液中处理 6 h 后存活率能达到 64.1%，说明菌株对人工肠液与人工胃液都有较好的耐受性，可以在肠道里生长繁殖并发挥其益生性能。

2.3.4 细胞自动聚集能力与细胞表面疏水性 潜在益生菌的自聚集能力和疏水性反映了细胞黏附肠道上皮细胞的能力^[22]。由表 5 可知，分离菌株的自动聚集性在 25% 以上，疏水性达到了 55% 以上，说明了分离菌株有着较好的肠道黏附性。

2.3.5 DPPH 自由基清除能力测定 根据表 6 可知，分离所得菌株的 DPPH 自由基清除率在 53% 左右，具有良好的抗氧化性能。

2.3.6 耐药性试验 选取 10 种抗生素药敏片对分离菌株进行药敏试验，结果显示分离菌株仅对链霉素、四环素 2 种抗生素存在耐药性，对其余 8 种抗生素均存在敏感性（表 7）。

2.3.7 溶血性试验结果 在 37℃ 恒温培养 24 h 后，分离菌株在哥伦比亚血平板中的生长情况良好，划线与点种所得菌落四周均无溶血现象产生，表明分离菌株无溶血活性（图 8）。

2.4 菌株对 ZEN 中毒小鼠的影响

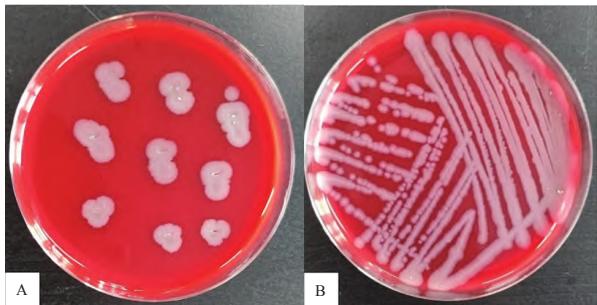
表 4 菌株在人工肠液和人工胃液内的存活率							%
指标	处理时间,h						
	0	1	2	3	4	5	
肠液存活率	100	84.23±1.27	75.62±1.78	69.35±1.77	59.23±1.56	47.82±2.15	45.47±1.91
胃液存活率	100	88.67±1.45	82.2±2.26	75.17±1.52	72.77±2.33	68.60±1.81	64.10±2.49

表 5 菌株的自动聚集性和疏水性		
菌株名称	自动聚集性,%	疏水性,%
H-1	26.42±0.94	55.61±1.57

表 6 DPPH 自由基清除能力测定结果			
样品 OD 值	对照 OD 值	空白 OD 值	DPPH 自由基清除率,%
0.327±0.052	0.615	0.044	53.98±1.76

表 7 耐药性试验结果			
抗生素	每片含量,μg	抑菌圈直径,mm	判定结果
氯霉素 Chloromycetin	30	31	S
青霉素 Penicillin	10	32	S
利福平 Rifampicin	5	24	S
红霉素 Erythromycin	15	20	S
链霉素 Streptomycin	10	10	R
四环素 Tetracycline	30	10	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	38	S
氧氟沙星 Loxacin	5	30	S
庆大霉素 Gentamycin	10	26	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	30	S

注：R：耐药 resistant；I：中度敏感 moderately sensitive；S：敏感 sensitive。



A：菌株在血平板中点种生长状况；B：菌株在血平板中划线生长状况。

图 4 分离菌株在哥伦比亚血平板中的形态

2.4.1 体重变化 如图 5 所示，ZEN 会对小鼠的体重产生一定影响，使其增重缓慢，ZEN 可以降低小鼠生长性能 ($P<0.05$)，而枯草芽孢杆菌 H-1 可以缓解 ZEN 对小鼠体重的影响，其对 ZEN 影响的生长性能有改善作用（表 8）。

2.4.2 器官系数变化 由表 9 可知，与对照组相比，ZEN 组肝脏和子宫卵巢系数增大 ($P<0.05$)，脾脏和胸腺系数下降，说明 ZEN 组小鼠出现了胸腺、脾脏萎缩和肝脏、子宫肿大，表明 ZEN 可以对小鼠的脏器造

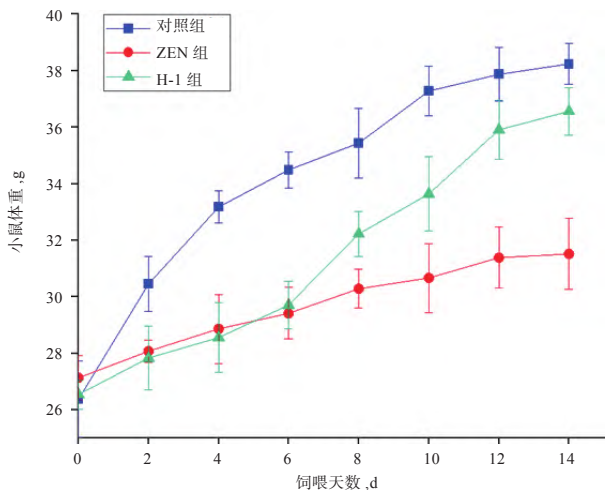


图 5 枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 中毒小鼠体重的影响

表 8 枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 中毒小鼠平均日增重的影响

项目	对照组	ZEN 组	H-1 组
平均日增重,g	11.86±0.51 ^a	4.38±1.33 ^b	10.01±1.61 ^a

注：同行数据上标字母相同表示差异不显著 ($P<0.05$)，字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)，下表同。

成一定的损伤。H-1 组对小鼠同时灌胃 ZEN 和枯草芽孢杆菌 H-1，结果发现与 ZEN 组相比，小鼠的肝脏系数降低，子宫卵巢系数降低 ($P<0.05$)，脾脏和胸腺系数均增大。结果表明枯草芽孢杆菌 H-1 能够缓解 ZEN 造成的小鼠脏器损伤。

表 9 枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 中毒小鼠器官系数的影响 %

项目	对照组	ZEN 组	H-1 组
肝脏系数	5.41±0.51 ^b	6.48±0.66 ^a	5.58±0.71 ^{ab}
胸腺系数	0.44±0.04 ^a	0.31±0.05 ^a	0.41±0.04 ^a
脾脏系数	0.34±0.05 ^a	0.25±0.07 ^a	0.34±0.02 ^a
子宫卵巢系数	0.25±0.05 ^b	0.44±0.05 ^a	0.26±0.04 ^b

2.4.3 血清指标 由表 10 可知，与对照组相比，ZEN 组 LH、E₂、FSH 含量均降低 ($P<0.05$)，这证明 ZEN 会造成机体的雌激素水平紊乱，损害雌性生殖系统。与 ZEN 组相比，H-1 组 LH、E₂、FSH 含量均有升高，说明枯草芽孢杆菌 H-1 对雌性小鼠的生殖系统具有保护作用，可以缓解 ZEN 对雌性生殖系统造成的损伤。

由表 11 可知，ZEN 组血清中 AST、ALT 水平升高 ($P<0.05$)，表明 ZEN 对小鼠的肝脏功能造成了一

表 10 枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 中毒小鼠性激素水平的影响

项目	对照组	ZEN 组	H-1 组
LH,IU/L	6.41±0.47 ^a	4.02±0.49 ^b	4.76±0.24 ^{ab}
E ₂ ,pg/mL	24.72±1.36 ^a	19.57±1.91 ^b	23.09±1.72 ^{ab}
FSH,IU/L	5.41±0.31 ^a	3.23±0.47 ^b	3.98±0.49 ^{ab}

表 11 枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 中毒小鼠血清生化指标的影响 U/L

项目	对照组	ZEN 组	H-1 组
ALT	49.24±4.45 ^b	84.29±9.57 ^a	60.8±4.39 ^b
AST	153.72±6.36 ^b	248.16±7.85 ^a	191.62±5.38 ^b

定损伤。与 ZEN 组相比，H-1 组 ALT、AST 水平降低（ $P<0.05$ ），说明枯草芽孢杆菌 H-1 对肝脏具有保护作用，可以缓解 ZEN 对肝脏造成的损伤。

3 讨 论

3.1 菌株对 ZEN 的降解效果 生物降解法具有低毒性、低污染、低残留、高效、特异性强、安全等优点，是 ZEN 脱毒的最佳方法，分离筛选出具有 ZEN 降解能力的益生菌株也是目前的研究热点。Lei 等^[23]从多个样本中分离出了 36 株细菌，其中有 5 株在液体培养基中表现出降低 50% 以上 ZEN 的能力；王泽贤^[24]对 1 株蜜环菌的培养条件进行了优化，最终测出其 ZEN 降解率为 78.72%。本试验筛选的枯草芽孢杆菌 H-1 的 ZEN 降解率可达 88.3%，具有良好的体外 ZEN 降解能力，大多数微生物降解 ZEN 的研究集中侧重在体外降解方面，这可能与部分研究用微生物不属于允许饲用的菌种有关，枯草芽孢杆菌属于我国农业部允许饲用的微生物菌种，具有较高的应用前景。

3.2 枯草芽孢杆菌 H-1 的益生性能 产酶能力是衡量一株益生菌益生功能的重要指标之一^[25]，本研究表明枯草芽孢杆菌 H-1 具有产纤维素酶与淀粉酶的能力。人体小肠中胆汁盐含量在 0.03%~0.3% 波动，菌株胆盐耐受性越高，就越能够在肠道转运过程中存活^[26-27]。本研究中，枯草芽孢杆菌 H-1 在 0.3% 浓度的胆盐条件下存活率达 72.4%，说明枯草芽孢杆菌 H-1 有着较好的胆盐耐受性。菌株要在动物体内发挥益生效果，需要对胃液有一定耐受性，胃液耐受性决定了菌株能否通过胃到达肠道下部发挥功效^[28]，在小肠中有各种消化酶对益生菌的存活、定植产生影响，对胃液与肠液有较好的耐受性的益生菌更容易在动物肠道内存活并定植^[29]，研究表明，枯草芽孢杆菌 H-1 在胃肠液中的存活率分别达到 64.1% 与

45.5%。说明枯草芽孢杆菌 H-1 可以耐受胃肠道环境，有利于其在胃肠道内存活与定植，H-1 的胆盐耐受性与对胃肠液的耐受能力与菌株本身生长繁殖的速度较快，同时可形成有极强抗逆作用的芽孢这一特性有关。

在益生菌被摄入后，黏附性较高的菌株够能在肠道较长时间停留并定植。Wadstrom 等^[30]试验发现，菌株的自动聚集性与疏水性可以反映其黏附能力的强弱。研究结果表明，枯草芽孢杆菌 H-1 的 4 h 自动聚集性在 25% 以上，高于李龙^[31]分离出的几株益生菌的自动聚集性。枯草芽孢杆菌 H-1 的疏水性达到了 55% 以上，与石超^[32]分离出的几株益生菌疏水性相当，说明枯草芽孢杆菌 H-1 有着较好的肠道黏附性，可在动物体内更好地发挥益生作用，不同菌株的黏附性差异可能与其表面黏附素结构组成不同有关。

对 DPPH 的清除能力可以用来评价抗氧化能力的强弱^[33]。枯草芽孢杆菌 H-1 的 DPPH 自由基清除率在 50% 以上，高于王惋等^[34]分离的具有抗氧化性的菌株，说明枯草芽孢杆菌 H-1 有较好的抗氧化性能，可在一定程度上避免氧化应激反应对机体造成的危害。

抗生素敏感性可作为菌株是否能应用于饲料添加剂方面的一个重要指标^[35]。陈童锦悦等^[36]通过纸片扩散法利用 11 类抗生素对 3 株枯草芽孢杆菌进行抗生素敏感性试验，耐药率最低的菌株仅对 3 种抗生素存在耐药性。本研究表明，枯草芽孢杆菌 H-1 对青霉素等多种抗生素存在敏感性，溶血活性是一个重要的生物安全指标，试验结果表明，枯草芽孢杆菌 H-1 无溶血活性，保证菌株可以安全进行动物实验。

3.3 菌株对 ZEN 中毒小鼠的影响 ZEN 对动物健康和生长速度产生影响，有研究表明，ZEN 中毒会导致采食减少，饲料转化率低等状况，进而造成体重增长缓慢^[37]。在本研究中，ZEN 可以显著降低小鼠生长性能，枯草芽孢杆菌 H-1 对 ZEN 影响的小鼠生长性能有显著的缓解作用，推测 H-1 对改善小鼠生长性能有一定积极作用。

脏器系数是临床上判断病理变化的常用指标，朱根生等^[38]通过研究发现，小鼠连续 12 d 灌服 40 mg/kg 剂量的 ZEN 后，肝脏系数显著增大，其原因可能是 ZEN 在肝脏代谢过程中导致的氧化损伤。卵巢、子宫是雌性动物重要的生殖器官，有研究表明^[39]，ZEN 具有较强的生殖毒性，能够引起生殖器官结构形态改变，进而影响生殖器官系数。胸腺和脾脏作为机体重要的

免疫器官,其功能正常运转有助于机体抵御各种疾病的发生,朱炜凤^[40]研究发现,在给小鼠连续30 d灌服40 mg/kg剂量ZEN后,小鼠的胸腺与脾脏系数及形态结构发生改变,胸腺和脾脏系数降低,说明机体免疫功能受到了影响。本研究显示,与对照组相比,ZEN组肝脏与子宫卵巢系数显著增加,胸腺和脾脏指数下降,脏器系数的异常可能与ZEN的多器官毒性有关。H-1组小鼠的肝脏系数降低,胸腺、脾脏系数上升,子宫卵巢系数显著降低,结合体外降解试验与肠道粘附性试验结果,推测H-1在小鼠肠道内定植后降解了摄入的部分ZEN,减少了ZEN的多器官毒性。

ZEN与E₂具有相似的结构,因此可以与E₂竞争性地结合雌激素受体,干扰雌激素合成。张琼琼等^[41]研究发现,采食ZEN日粮小鼠血清中E₂、FSH、LH水平均有降低。结合卵巢子宫器官系数上升,推测ZEN可能通过影响血清中雌激素水平,进而影响子宫和卵巢的形态结构。本研究结果表明,ZEN可使小鼠血清中LH、E₂、FSH含量显著降低,枯草芽孢杆菌H-1可以缓解ZEN对雌性生殖系统造成的损伤,推测H-1通过降解部分ZEN,减少对雌激素合成的干扰,从而降低ZEN的生殖毒性。AST和ALT是反映肝功能的重要指标,临床上常用AST和ALT作为诊断肝脏疾病的重要依据,由于ZEN主要在肝脏中代谢,且有研究表明,由ZEN诱导的肝损伤与氧化应激有关,AST与ALT指标的升高可能与ZEN造成的肝脏氧化损伤有关^[42]。本研究发现ZEN组小鼠血清的ALT与AST水平显著升高,表明ZEN会使小鼠肝脏受到损伤;与ZEN组相比,H-1组ALT水平显著下降,AST水平显著下降,表明枯草芽孢杆菌H-1可以缓解ZEN对肝脏造成的损伤。与DPPH清除能力结果相联系,推测枯草芽孢杆菌H-1可以提高抗氧化水平,从而减少ZEN引起的自由基的过度积累,进而缓解ZEN造成的肝脏氧化损伤。此外,枯草芽孢杆菌H-1虽有良好的体外降解ZEN能力,且对小鼠玉米赤霉烯酮中毒造成的损伤有良好的缓解作用,但其体外脱毒与缓解ZEN中毒损伤的机理尚不明确,有待于进一步研究。

4 结 论

本研究自土壤中分离出1株具有体外降解ZEN能力的菌株H-1,经鉴定后确认菌株为枯草芽孢杆菌,其

具有良好的益生性能,对多种抗生素敏感,无溶血活性。H-1可缓解ZEN造成的小鼠生长性能下降、器官系数异常以及雌激素水平紊乱问题,降低ZEN对小鼠肝脏与生殖系统造成的损伤。

参考文献:

- [1] Ropejko K, Twarużek M. Zearalenone and its metabolites—General overview, occurrence, and toxicity[J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 35.
- [2] Gao X, Xiao Z H, Liu M, et al. Dietary silymarin supplementation alleviates zearalenone-induced hepatotoxicity and reproductive toxicity in rats[J]. *J Nutr*, 2018, 148(8): 1209-1216.
- [3] 刘同威,李爱科,孙肖明,等.饲料原料中霉菌毒素对动物的危害及其检测和消减措施[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(3): 632-643, 650.
- [4] 刘建高,厉学武,彭哲,等.2021年我国饲料原料中常见霉菌毒素污染情况调查[J]. *中国家禽*, 2023, 45(10): 70-75.
- [5] Pirouz A, Selamat J, Iqbal S, et al. The use of innovative and efficient nanocomposite (magnetic graphene oxide) for the reduction on of *Fusarium* mycotoxins in palm kernel cake[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): e12453.
- [6] 叶盛群.腐殖酸钠去除霉菌毒素效果的研究[D].成都:四川农业大学,2009.
- [7] Marković M, Daković A, Rottinghaus G E, et al. Adsorption of the mycotoxin zearalenone by clinoptilolite and phillipsite zeolites treated with cetylpyridinium surfactant[J]. *Colloids Surf B*, 2017, 151: 324-332.
- [8] Polak M, Gajecki M, Kulik T, et al. The evaluation of the efficacy of sodium carbonate as zearalenone destructor in feeding stuffs[J]. *Pol J Vet Sci*, 2009, 12(1): 103.
- [9] 王晓璐,罗会颖,姚斌.饲料霉菌毒素的生物降解研究进展[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(10): 6152-6159.
- [10] 文钧,熊东炜,龙森.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、培养条件优化及降解酶挖掘[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(11): 7422-7432.
- [11] 王悦.有效清除玉米赤霉烯酮并正向调节肠道菌群的菌株分离与研究[D].西安:西北大学,2018.
- [12] 耿凯伟.解淀粉芽孢杆菌H6发酵条件优化及其降解玉米赤霉烯酮效果评价[D].郑州:河南农业大学,2023.
- [13] 沈萍,陈向东.微生物学实验(第5版)[M].北京:高等教育出版社,2018.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [15] 刘晨.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究[D].郑州:河南工业大学,2022.
- [16] 赵斌,林会,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2014.
- [17] Guo Z, Wang J, Yan L, et al. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2009, 42(10): 1640-1646.

- [18] 于秀菊, 胡燕姣, 孙铮, 等. 羊驼源地衣芽孢杆菌 SXAU08 的益生功能评价及其对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2024, 36(10): 6780-6790.
- [19] 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: 1641-1648.
- [20] Pelka K, Hafeez A B, Worobo R W, *et al.* Probiotic potential of *Bacillus* Isolates from Polish Bee Pollen and Bee Bread[J]. Probiotics Antimicrob, 2023: 1-14.
- [21] 刘洋, 郭宇星, 潘道东. 4 种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 25-29.
- [22] Isenring J, Geirnaert A, Lacroix C, *et al.* Bistable auto-aggregation phenotype in *Lactiplantibacillus plantarum* emerges after cultivation in in vitro colonic microbiota[J]. BMC Microbiol, 2021, 21: 1-13.
- [23] Lei Y P, Zhao L H, Ma Q G, *et al.* Degradation of zearalenone in swine feed and feed ingredients by *Bacillus subtilis* ANSB01G[J]. World Mycotoxin J, 2014, 7(2): 143-151.
- [24] 王泽贤, 赵宇楠, 贾丹丹, 等. 蜜环菌 Am-07-22 发酵对玉米赤霉烯酮降解效果影响及机理初探 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 162-169.
- [25] 游龙, 韩茵, 张凯, 等. 芽孢杆菌产胞外酶的活性分析及其对凡纳滨对虾的作用 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2018, 48(3): 80-87.
- [26] 刘之园, 贾俊霞, 姜昊蔚, 等. 耐酸耐胆盐益生菌的筛选及其益生特性研究 [J]. 中国酿造, 2020, 39(11): 103-108.
- [27] 陈仪婷, 张红星, 谢远红, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其耐酸耐胆盐性能研究 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 29-33.
- [28] Ru X, Zhang C C, Yuan Y H, *et al.* Bile salt hydrolase activity is present in nonintestinal lactic acid bacteria at an intermediate level[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103: 893-902.
- [29] Zhang L, Ma H, Kulyar M F A, *et al.* Complete genome analysis of *Lactobacillus fermentum* YLF016 and its probiotic characteristics[J]. Microb Pathogenesis, 2022, 162: 105212.
- [30] Wadström T, Andersson K, Sydow M, *et al.* Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs[J]. J Appl Bacteriol, 2010, 62(6): 513-520.
- [31] 李龙. 藏鸡源乳酸菌和红景天对肉鸡生产性能、腹水敏感性和肠道功能的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [32] 石超. 传统发酵牦牛酸奶中降胆固醇乳酸菌的筛选及其对高脂模型大鼠的益生作用 [D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [33] 代玉明, 黄涛, 熊涛. 鸡源凝结芽孢杆菌的筛选鉴定及益生性能评价 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 2022, 46(4): 464-472, 480.
- [34] 王悦, 侯俊财, 于彤, 等. 具有抗氧化和抑菌能力的益生性乳酸菌筛选及鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 43-49.
- [35] 陈曦, 李欣翼, 陈发顺, 等. 5 株解淀粉芽孢杆菌的益生特性及抑菌活性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(5): 2082-2091.
- [36] 陈童锦悦, 覃绍敏, 韦珏, 等. 竹鼠源产纤维素酶枯草芽孢杆菌的生物学特性研究及安全性初步评价 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(3): 201-206.
- [37] Bai J, Zhou Y, Luo X, *et al.* Roles of stress response-related signaling and its contribution to the toxicity of zearalenone in mammals[J]. Compr Rev Food Sci F, 2022, 21(4): 3326-3345.
- [38] 朱根生, 夏苏干, 余进进, 等. 白藜芦醇对玉米赤霉烯酮致小鼠肝脏氧化损伤及炎症的保护作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(11): 4254-4261.
- [39] 刘淑杰, 邓波, 吴杰, 等. ZEN 污染饲料中添加植物炭黑对大鼠脏器组织、抗氧化指标及免疫功能的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(1): 225-230.
- [40] 朱炜凤. 金丝桃苷通过 ROS/Nrf2/Cyt-c 缓解玉米赤霉烯酮暴露诱导小鼠脾细胞凋亡的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [41] 张琼琼, 王亚男, 唐贱, 等. 芦丁对玉米赤霉烯酮诱导的雌鼠生殖器官损伤的缓解作用 [J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(5): 278-284.
- [42] 朱云迪, 杨青, 王新芳, 等. 3 种中药成分对玉米赤霉烯酮致小鼠肝脏损伤的缓解作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(1): 434-442.

(责任编辑: 周会会)