

酸解氧化魔芋葡甘聚糖对齐口裂腹鱼肠道微生物的影响

杨 敏, 陈明睿, 邬应龙*, 严秋萍, 曾丽萍

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 探讨了氧化魔芋葡甘聚糖酸解产物对齐口裂腹鱼肠道微生物的影响。选取平均体质量为 81 ± 2.64 g 健康齐口裂腹鱼 360 尾, 随机分为 4 组(每组 3 个重复, 每个重复 30 尾), 分别为对照组(饲喂基础饲料)、LOKGM-0.8%组(基础饲料+0.8%LOKGM)、LOKGM-1.6%组(基础饲料+1.6%LOKGM)和 LOKGM-3.2%组(基础饲料+3.2%LOKGM), 试验期 75 d(驯养期 15 d, 正试期 60 d)。采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对齐口裂腹鱼后肠肠道内容物细菌 16S rDNA V3 可变区进行菌群多样性分析, 利用实时荧光定量 PCR 技术对肠道中嗜水气单胞菌及芽孢杆菌的数量进行定量分析。结果表明:与对照组相比, LOKGM-1.6%与 LOKGM-3.2%组后肠肠道菌群多样性显著增加($P < 0.05$), LOKGM-0.8%组无显著影响($P > 0.05$); LOKGM-0.8%组齐口裂腹鱼前肠和中肠嗜水气单胞菌的数量显著减少($P < 0.05$), 前肠芽孢杆菌的数量显著增加($P < 0.05$); LOKGM-1.6%组前中后肠嗜水气单胞菌数量均显著减少($P < 0.05$), 中肠与后肠芽孢杆菌数量显著增加($P < 0.05$); LOKGM-3.2%组前肠和后肠嗜水气单胞菌的数量显著减少($P < 0.05$), 前肠和中肠芽孢杆菌数量显著增加($P < 0.05$)。由此得出:氧化魔芋葡甘聚糖酸解产物能够改善齐口裂腹鱼的肠道菌群结构, 有利于保持鱼体健康。

关键词: 氧化魔芋葡甘聚糖酸解产物; 齐口裂腹鱼; 变性梯度凝胶电泳; 实时定量 PCR; 肠道微生物
中图分类号: TS 254.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)11—1225—07

Effects of Dietary Acidolysis Products of Oxidized Konjac Glucomannan on Intestinal Microflora of *Schizothorax prenanti*

YANG Min, CHEN Mingrui, WU Yinglong*, YAN Qiuping, ZENG Liping

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To study the effects of dietary acidolysis products of oxidized konjac glucomannan (OKGM) on intestinal microflora of *Schizothorax prenanti*. A total of three hundred and sixty healthy fishes with average body weight of 81 ± 2.64 g were randomly divided into 4 groups with 3 replicates and 30 fishes per replicate. The 4 groups were control group (basal diet), LOKGM-0.8% group (basal diet + 0.8% LOKGM), LOKGM-1.6% group (basal diet + 1.6% LOKGM), LOKGM-3.2% group (basal diet + 3.2% LOKGM), respectively. The experiment lasted for 75 d (15 d for

收稿日期: 2015-12-23

* 通信作者: 邬应龙(1963—), 男, 四川开江人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能性食品研究。E-mail: wuyinglong99@163.com

引用本文: 杨敏, 陈明睿, 邬应龙, 等. 酸解氧化魔芋葡甘聚糖对齐口裂腹鱼肠道微生物的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1225-1231.

adaptation and 60 d for test). Diversity of posterior gut microflora was determined based on V3 variable regions of bacteria 16S rDNA by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique. The number of *Aeromonas hydrophila* and *Bacillus* in the intestinal was quantified by real-time quantitative PCR. The results showed as follows: compared with the control group, the diversity of posterior intestinal microflora was significantly increased in the LOKGM-1.6% and LOKGM-3.2% group ($P < 0.05$), but the diversity of posterior intestinal microflora was not affected in the LOKGM-0.8% group ($P > 0.05$); the number of *Aeromonas hydrophila* in anterior and middle intestinal of *Schizothorax prenanti* was significantly decreased in the LOKGM-0.8% group ($P < 0.05$), also the number of *Bacillus* in anterior intestinal was significantly increased ($P < 0.05$); the number of *Aeromonas hydrophila* in anterior, middle and posterior intestinal was all significantly decreased in LOKGM-1.6% group ($P < 0.05$) and the number of *Bacillus* in middle and posterior intestinal was significantly increased ($P < 0.05$); the number of *Aeromonas hydrophila* in anterior and posterior intestinal was significantly decreased in LOKGM-3.2% group ($P < 0.05$), besides, the number of *Bacillus* in anterior and middle intestinal was significantly increased ($P < 0.05$). In conclusion, acidolysis products of oxidized konjac glucomannan can improve the configuration of posterior intestinal microflora of *Schizothorax prenanti* and keep the fish healthy.

Keywords: acidolysis products of oxidized konjac glucomannan, *Schizothorax prenanti*, DGGE, real-time quantitative PCR, intestinal microflora

肠道微生物的结构在动物生长发育过程中有非常重要的作用,其平衡状态与宿主的健康息息相关。正常的肠道菌群可以帮助宿主更好地消化吸收营养物质,同时还能调节宿主的免疫功能,维持机体健康^[1]。某些益生菌如乳酸杆菌、双歧杆菌等,能参与糖类和蛋白质的代谢并合成宿主生长发育所必需的营养素,还能促进铁、镁、锌等矿质元素的吸收。这些营养物质的缺少或者肠道菌群结构失衡,就会引起机体多种疾病爆发^[2]。肠道是病原微生物入侵鱼类机体的主要部位之一,也是保障鱼类健康的一道重要屏障^[3]。

近年来,水产养殖中抗生素滥用所引出的问题,如抗药性、药物残留和环境污染等,引起广泛关注,因此,寻找抗生素的替代物成了动物营养和饲料研究的热点。益生元又被称作膳食纤维(Dietary Fiber, DF),是一种安全无毒且不被动物体消化吸收而被肠道微生物发酵利用的物质。由于它能选择性地促进有益菌增殖,抑制有害菌生长,还能增强动物机体的免疫功能而被广泛应用于养殖业。大量研究证实益生元物质在调节动物肠道菌群稳态、增强机体先天免疫、提高抗病能力、促进生长方面具有显著作用^[4]。魔芋葡甘露聚糖(Konjac Gluco-

mannan, KGM)是魔芋块茎中含有的多糖,由 β -D-葡聚糖和 β -D-甘露糖通过 β -1,4糖苷键结合而成,是一种优异的膳食纤维,已有研究证实KGM能够通过肠道厌氧菌发酵产生短链脂肪酸从而调节肠道菌群结构,促进机体免疫,维持健康。氧化魔芋葡甘露聚糖(Oxidized Konjac Glucomannan, OKGM)是由魔芋葡甘露聚糖经双氧水氧化而得到的,其黏度比KGM低,是一种可溶性的膳食纤维,已被证实对动物免疫等有一定的影响^[5]。酸解氧化魔芋葡甘露聚糖降低了OKGM的分子量,促进其溶解性,使得OKGM更易发挥其生物功能。本试验旨在探讨酸解氧化魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼肠道菌群多样性等的影响,为进一步扩大魔芋的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氧化魔芋葡甘露聚糖(由四川农业大学食品学院功能性食品实验室提供),OKGM经由盐酸酸解得到酸解氧化魔芋葡甘露聚糖,即低分子量的氧化魔芋葡甘露聚糖(Low-Molecular Weight Oxidized Konjac Glucomannan, LOKGM,黏均分子量为92 kDa)。

试剂:E.Z.N.A[®] Stool DNA Kit 美国 Omega 公司;Tris 美国 Sigma 公司;甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、去离子甲酰胺、尿素(分析纯) 美国 Amresco 公司;2×Taq PCR Master Mix、SYBR Green、2×SYBR Premix Ex Tap[™] 大连 TaKaRa 公司。

嗜水气单胞菌与芽孢杆菌标准品是由齐口裂腹鱼肠道中分离、纯化、鉴定得到。

1.2 仪器与设备

普通 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、水平电泳槽(北京六一仪器厂)、DYCP-31CN 电泳仪(上海恒勤仪器设备有限公司)、Biosence 凝胶成像系统(上海圣科仪器设备有限公司)、微量移液器(德国 Eppendorf 公司)、JY-TD331 变性梯度凝胶电泳仪(济南非凡科学器材有限公司)、CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、玻璃鱼缸(规格:70 cm×50 cm×70 cm)。

1.3 实验动物

齐口裂腹鱼购自四川雅安天全养鱼场,平均体质量 81±2.64 g,购回后先驯养 15 d。

1.4 试验设计与饲养管理

齐口裂腹鱼 240 尾,随机分为 4 组(每组 3 个重复,每个重复 30 尾),分别为对照组(基础饲料)、LOKGM-0.8%(在基础饲料中添加 0.8% 的 LOKGM)、LOKGM-1.6%(在基础饲料中添加 1.6% 的 LOKGM)和 LOKGM-3.2%(在基础饲料中添加 3.2% 的 LOKGM)。基础饲料组成及营养水平见表 1。饲养期间,每天按每缸体质量总重 1.5% 投喂饲料;每天换水,换水量占总体积的 1/3,并清除缸内不溶物。饲养期 60 d,每天记录水温,24 h 不间断充氧气。饲养期间保持微流水。

1.5 样品的采集

饲养结束后,鱼体饥饿 24 h,解剖取样。将健康的齐口裂腹鱼用生理盐水洗净后,再用 75% 的酒精对体表面进行消毒,低温无菌条件下剪开腹腔,取出肠道,剔除肠部脂肪,将肠道分为前中后肠,分别用无菌镊子挤出肠道内容物于无菌无酶 2 mL EP 管中,-20℃保存,以备肠道内容物 DNA 的提取。

1.6 样品 DNA 提取及 PCR 扩增

肠道内容物总 DNA 的提取参照 E.Z.N.A[®] Stool DNA Kit 试剂盒说明书进行。总 DNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,-20℃保存备用。

表 1 饲料组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets

原料	组别			
	C	LOKGM-0.8%	LOKGM-1.6%	LOKGM-3.2%
鱼粉	42.00	42.00	42.00	42.00
面粉	25.40	25.40	25.40	25.40
豆粕	21.00	21.00	21.00	21.00
甘薯淀粉	4.60	3.80	3.00	1.40
氧化魔芋葡甘聚糖酸解物 LOKGM	0.00	0.80	1.60	3.20
菜油	3.00	3.00	3.00	3.00
麸皮	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼用多维+胆碱	0.50	0.50	0.50	0.50
营养成分(质量分数/%)				
粗蛋白	36.40	36.40	36.40	36.40
粗脂肪	5.10	5.10	5.10	5.10
总能(kJ/kg)	13.54	13.31	13.30	13.06

注:(1)饲料组成部分是指每千克饲料含:VA 6 000 IU;VD 1 000 IU;VE 30 mg;VK₃ 0.46 mg;VB₁ 0.72 mg;VB₂ 5.76 mg;VB₆ 4.212 mg;尼克酸 27.72 mg;泛酸 27 mg;生物素 0.16 mg;Vc 55.8 mg;肌醇 58.8 mg;氯化胆碱 700 mg。(2)营养成分部分是指每千克饲料含:锰 Mn 10 mg;锌 Zn 30 mg;铁 Fe 60 mg;铜 Cu 3 mg;碘 I 1 mg;硒 0.2 mg

PCR 扩增:参考 Hovda 等^[6]的引物 BA338f、UN518r(见表 2),以肠道内容物总 DNA 为模板,特异性扩增细菌的 16S rDNA 基因序列的 V3 可变区,扩增片段长度大约 200 bp。PCR 反应体系(25 μL):上、下游引物各 1.25 μL、DNA 模板 2.5 μL、ddH₂O 7.5 μL、2×PCR Master Mix 12.5 μL。扩增程序:92℃预变性 2 min,92℃变性 1 min、55℃退火 30 s、72℃延伸 1 min,30 个循环,最后 72℃延伸 6 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,-20℃保存备用。

1.7 DGGE 及图谱分析

采用 JY-TD331 变性梯度凝胶电泳仪(济南非凡科学器材有限公司)对 PCR 产物进行 DGGE 分析。DGGE 的参数为:电泳液:0.5×TAE Buffer;胶质量分数:8%;变性胶(变性剂为去离子甲酰胺和尿

素)梯度为 30%~55%;电泳条件:60 ℃,200 V 预电泳 10 min,然后 100 V,16 h。电泳结束后,用硝酸银进行染色,显色定影后用凝胶成像系统进行拍照。DGGE 指纹图谱通过 Quantity One 4.6.2 软件进行相似性及多样性分析。

表 2 DGGE 引物及序列

Table 2 PCR primers used for DGGE analysis and sequencing

引物	引物序列(5'-3')		扩增产物大小/bp
BA338f	ACTCCTACGGGAGGC AGCAG	16S rDNA V3 区	200
UN518r	ATTACCGCGGCTGCTG G	16S rDNA V3 区	
GC 夹子	5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G		

注:GC 夹子添加在引物 BA338f 5'端

1.8 实时荧光定量 PCR 分析

参考 Wang 等^[7]和相振田^[8]的引物(见表 3),以肠道内容物总 DNA 为模板进行定量分析。

表 3 实时定量 PCR 引物序列

Table 3 Real-time quantitative PCR primer sequence

目标菌	引物	引物序列(5'-3')	扩增产物大小/bp
嗜水气单胞菌	AHH-F	GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAG TT	130
	AHH-R	GAGCGGCTG GAT GCGGTTGT	
芽孢杆菌	F	GCAACGAGCGCAACCCTTGA	92
	R	TCATCCCCACCTTCTCCGGT	

1.8.1 引物鉴定 反应体系(10 μL):上、下游引物各 0.2 μL,2×Taq Master Mix 5 μL,模板 0.4 μL,去离子水 4.2 μL。

嗜水气单胞菌扩增条件为:预变性 95 ℃ 5 min,95 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。芽孢杆菌扩增条件为:预变性 95 ℃ 3 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 20 s,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物由 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并割胶回收测序。

1.8.2 标准曲线的制作及样品测定 参考 Balczar 等^[9]方法稍作修改。采用 SYBR Green I 荧光染料法,10 μL 反应体系,含 5 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (2×)、标准品 1 μL、上下游引物各 0.25 μL、DEPC 水 3.5 μL。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,62.6 ℃

30 s,39 个循环后,进行 95 ℃ 处理 10 s;扩增完毕后,迅速降温到 65 ℃ 进行溶解曲线分析,然后以 0.5 ℃/s 的速率从 65 ℃ 递增到 95 ℃,连续测定样品荧光强度以获取溶解曲线。用荧光定量 PCR 技术对不同浓度标品进行定量,最后以菌落数为横坐标,Ct 值为纵坐标,绘制标准曲线。

样品测定与标准曲线测定使用的反应体系和扩增条件一致。

1.9 数据处理

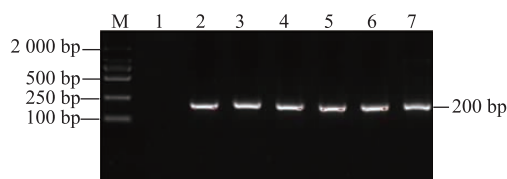
DGGE 指纹图谱通过 Quantity One 4.6.2 软件,采用 UPGMA 进行相似性聚类分析,多样性指数用 Shannon-Weiner 指数(H')表示,按照公式计算: $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$,其中 $P_i = n_i/H$ (n_i 为某一条带的峰高, H 为泳道密度曲线所有峰高的总和)。

所有数据经 Excel 2003 初步整理后,利用 SPSS20.0 对数据进行 one-way ANOVA 分析,采用 Duncan 法进行多重比较,结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 氧化魔芋葡甘露聚糖酸解物对肠道菌群多样性的影响

2.1.1 齐口裂腹鱼肠道菌群 16S rDNA 的 V3 区 PCR 扩增结果 以提取的微生物 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,产物通过 1.5%琼脂糖凝胶检测后发现,均能得到约 200 bp 的目的产物,且条带清晰明亮,满足 DGGE 分析的要求(见图 1)。



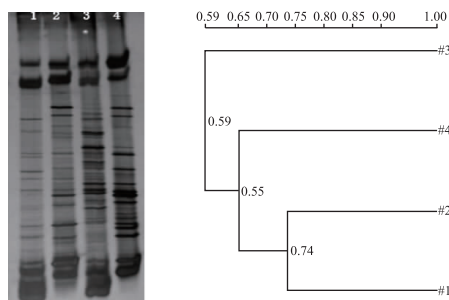
1-空白;2-LOKGM-3.2%组;3-LOKGM-1.6%组;4-LOKGM-0.8%组;5,6,7-Control 组

图 1 齐口裂腹鱼肠道菌群 16S rDNA V3 区片段 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of 16S rDNA V3 region of intestinal microflora of *Schizothorax prenanti*

2.1.2 DGGE 图谱的多样性及相似性分析 DGGE 图谱上的条带反映了齐口裂腹鱼肠道中的优势菌群,条带数量和位置的复杂性说明了菌群的多样性。齐口裂腹鱼饲喂 OKGM 酸解物后后肠道菌群的

DGGE 图谱(见图 2)中,以 UPGAM 进行聚类分析可知,LOKGM-1.6%、LOKGM-3.2%与基础组聚为一类,而 LOKGM-0.8%单独为一类,说明 LOKGM-0.8%组后肠菌群结构较为不同。



1-LOKGM-3.2%组;2-LOKGM-1.6%组;3-LOKGM-0.8%组;4-Control 组

图 2 齐口裂腹鱼后肠菌群 16S rDNA 扩增产物的 DGGE 图谱及图谱的聚类分析

Fig. 2 DGGE profile of 16S rDNA amplified products of posterior intestinal microflora of *Schizothorax prenanti* and cluster analysis of the DGGE profile

添加 OKGM 酸解物使齐口裂腹鱼后肠菌群的多样性发生了显著的变化(见图 3)。对照组、LOKGM-0.8%、LOKGM-1.6%、及 LOKGM-3.2%组的多样性指数分别为 1.76、1.79、1.96、1.92。与对照组相比,LOKGM-1.6%与 LOKGM-3.2%组后肠肠道菌群多样性显著增加($P<0.05$),而 LOKGM-0.8%组却无显著影响,说明 OKGM 酸解物对齐口裂腹鱼后肠肠道菌群结构有影响,影响程度可能与添加剂量有关。

肠道菌群是肠道的重要组成部分,是肠道微生物与宿主以及所处的环境形成的相互依赖、相互制约的微生物体系。它能够帮助宿主更好地消化吸收营养物质,还能调节机体的免疫功能,维持宿主健康^[10]。菌群多样性以多样性指数来表示,菌群多样性指数是反映菌群平衡的重要指标,通常该数值越高,菌群平衡就越难被破坏^[11]。本实验结果表明,实验组多样性指数均高于基础组,且中剂量和高剂量组显著高于基础组,说明饲料中添加 LOKGM 有利于保持齐口裂腹鱼后肠菌群结构的平衡。Zheng 等^[12]的结果也证明 OKGM 能够增加齐口裂腹鱼肠道菌群多样性,这与本实验结果一致。Dimitroglou 等^[13]的研究证明饲料中添加甘露寡糖增加了金头鲷肠道菌群多样性以及物种丰富度,降低了各组之间的肠

道菌群组成的相似性,且影响程度与添加剂量有关。

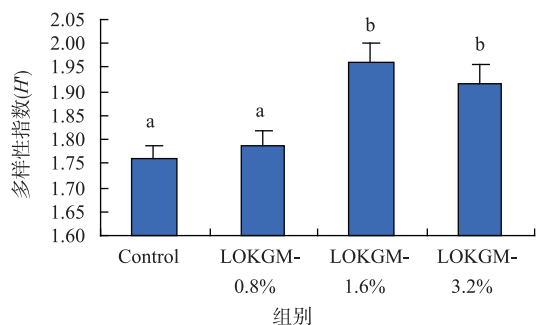


图 3 齐口裂腹鱼后肠菌群的多样性

Fig. 3 Diversity of posterior intestinal microflora of *Schizothorax prenanti*

实验组与基础对照组肠道菌群的相似性(见表 4),LOKGM-3.2%与 LOKGM-1.6%组为中等相似,相似性系数达到 69.4;而 LOKGM-3.2%与 LOKGM-0.8%、基础组相似性较低,相似性系数分别为 55.1 和 58.1。LOKGM-1.6%与 LOKGM-0.8%、基础组以及 LOKGM-0.8%与基础组也是中等相似水平,相似性系数分别为 67.8、67.7、65.0。

表 4 齐口裂腹鱼后肠肠道菌群 DGGE 图谱的相似系数
Table 4 Similarity coefficients of the DGGE profile of posterior intestinal of *Schizothorax prenanti*

组别	LOKGM-3.2%	LOKGM-1.6%	LOKGM-0.8%	Control
LOKGM-3.2%	100.0			
LOKGM-1.6%	69.4	100.0		
LOKGM-0.8%	55.1	67.8	100.0	
Control	58.1	67.7	65.0	100.0

2.2 氧化魔芋葡甘露聚糖酸解物对几种肠道微生物数量的影响

根据实时定量 PCR 标准曲线 7 个浓度的 Ct 值和标准嗜水气单胞菌的菌落数计算,得出标准曲线(见图 4、图 5)分别为:嗜水气单胞菌 $y=-2.593 6x+41.143$, $R^2=0.996 2$;芽孢杆菌 $y=-3.147 4x+45.394$, $R^2=0.991 6$ 。各浓度梯度与 Ct 值的相关系数均达到 0.99 以上。重复性好,符合作为标准曲线的要求。

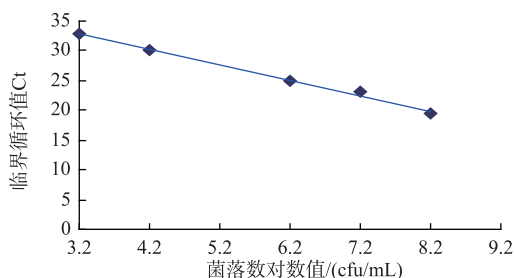


图4 嗜水气单胞菌的标准曲线图

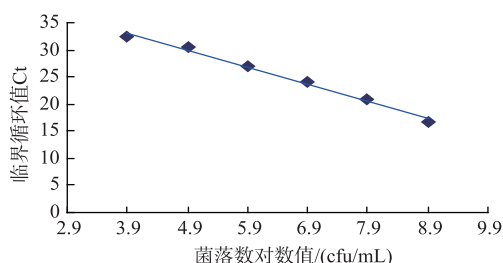
Fig. 4 Standard curve of *Aeromonas hydrophila*

图5 芽孢杆菌的标准曲线图

Fig. 5 Standard curve of *Bacillus*

对齐口裂腹鱼肠道总菌以及嗜水气单胞菌和芽孢杆菌进行定量分析(见表5)。由表5可知,饲料中添加 LOKGM 对嗜水气单胞菌以及芽孢杆菌均有显著影响。与对照组相比,LOKGM 显著降低了齐口裂腹鱼前肠嗜水气单胞菌的数量($P<0.05$);中肠除 LOKGM-3.2% 组无显著影响,LOKGM-0.8%、LOKGM-1.6% 组嗜水气单胞菌数量均显著降低($P<0.05$);后肠中只有 LOKGM-3.2% 组嗜水气单胞菌的数量显著降低($P<0.05$),另外两组则无显著影响。LOKGM-0.8% 组前肠和中肠嗜水气单胞菌的数量显著减少($P<0.05$),对后肠则无显著影响;LOKGM-1.6% 组前中后肠的影响相同,均显著减少($P<0.05$);LOKGM-3.2% 组前肠和后肠嗜水气单胞菌的数量显著减少($P<0.05$),中肠则无显著影响。与对照组相比,饲料中添加 LOKGM 能使前肠芽孢杆菌的数量显著增加($P<0.05$);而中肠除 LOKGM-0.8% 组无显著影响,其他两组芽孢杆菌的数量均显著增加

($P<0.05$);后肠中,除 LOKGM-0.8% 组芽孢杆菌的数量显著降低($P<0.05$),另两组芽孢杆菌的数量均显著增加($P<0.05$)。LOKGM-0.8% 组齐口裂腹鱼前肠芽孢杆菌的数量显著增加($P<0.05$),对中肠和后肠无显著影响;LOKGM-1.6% 组中肠与后肠芽孢杆菌的数量显著增加($P<0.05$),对前肠则无显著影响;LOKGM-3.2% 组前肠和中肠芽孢杆菌的数量显著增加($P<0.05$),对后肠则无显著影响。

嗜水气单胞菌是鱼类条件致病菌,芽孢杆菌在水产养殖方面是一种益生菌,并且对嗜水气单胞菌有一定的抑制作用^[14]。Daniels 等^[15]研究了饲料中添加 MOS 与芽孢杆菌对欧洲龙虾幼虾肠道菌群的影响,发现单独添加 MOS 和芽孢杆菌对龙虾肠道菌群多样性及物种丰富度均无显著影响,同时添加 MOS 与芽孢杆菌则能够降低欧洲龙虾幼虾肠道菌群物种丰富度及多样性。研究中应用实时荧光定量 PCR 分析了齐口裂腹鱼肠道中嗜水气单胞菌和芽孢杆菌的数量,结果发现 OKGM 酸解物能够降低肠道中嗜水气单胞菌的数量,增加芽孢杆菌的数量。分析原因可能是 OKGM 酸解物在肠道中被厌氧菌发酵产生短链脂肪酸(SCFA),降低肠道环境 pH,促进乳酸菌等有益菌的生长,从而使有害菌数量减少。Connolly 等^[16]的研究证实魔芋葡甘聚糖水解物增加了短链脂肪酸的含量及双歧杆菌的数量。Kühlwein 等^[17]在饲料中添加 β -(1,3)(1,6)-D-葡聚糖饲喂镜鲤 2 周,PCR-DGGE 结果显示 β -(1,3)(1,6)-D-葡聚糖添加量为 0.1%、2% 时,显著降低了镜鲤肠道的可操作单元(OTUs)数量,同时显著降低了所有剂量组的物种丰富度,但对物种多样性及均匀度无显著影响;研究还证实 β -(1,3)(1,6)-D-葡聚糖的添加能够降低肠道中嗜水气单胞菌的数量。这与本研究结果一致。Dimitroglou 等^[18]的研究也发现 MOS 显著降低了虹鳟肠道存活菌群数量,与对照组相比,虹鳟幼鱼 MOS 组微球菌属、气单胞菌属以及弧菌属数量显著降低。

表5 齐口裂腹鱼肠道细菌的数量

Table 5 Number of bacterium in intestinal of *Schizothorax prenanti*

组别	嗜水气单胞菌/ 10^4			芽孢杆菌/ 10^4		
	前肠	中肠	后肠	前肠	中肠	后肠
Control	1.87±0.69 ^a	0.96±0.58 ^a	0.55±0.21 ^{ab}	1.68±0.59 ^c	4.20±2.10 ^b	4.77±2.11 ^b
LOKGM-0.8%	0.98±0.40 ^b	0.16±0.03 ^b	0.63±0.16 ^a	6.34±1.75 ^a	2.13±0.51 ^{ab}	1.49±0.40 ^c
LOKGM-1.6%	0.22±0.03 ^b	0.24±0.02 ^b	0.08±0.02 ^{bc}	3.09±0.95 ^{bc}	4.51±0.07 ^a	7.94±0.56 ^a
LOKGM-3.2%	0.20±0.11 ^b	1.16±0.25 ^a	0.31±0.01 ^c	4.48±0.52 ^{ab}	4.86±0.77 ^a	6.83±1.58 ^{ab}

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

3 结 语

综上所述,饲喂氧化魔芋葡甘露聚糖酸解物可以通过增加齐口裂腹鱼肠道菌群多样性来保持菌

群平衡的稳态不被破坏;促进肠道益生菌芽孢杆菌的增殖,抑制有害菌嗜水气单胞菌的生长;并且,此添加物对齐口裂腹鱼肠道微生物的影响在添加量为 1.6%时效果最佳。

参考文献:

- [1] YANG Binbin,SHAO Qingjun. The research progress of fish intestinal microbes [J]. **Chinese Feeding**,2013,23:1-4. (in Chinese)
- [2] XU X F,XU P P,MA C W,et al. Gut microbiota,host health,and polysaccharides [J]. **Biotechnology Advances**,2013,31: 318-337.
- [3] MERRIFIELD D L,DIMITROGLOU A,FOEY A,et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids[J]. **Aquaculture**,2010,302:1-18.
- [4] WANG Na,SHANG Zhiwei,ZHAO Min. Effects of probiotics on growth and intestinal microflora of piglets[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(3):255-260. (in Chinese)
- [5] ZHANG L,WU Y L,WANG L,et al. Effects of oxidized konjac glucomannan (OKGM) on growth and immune function of *Schizothorax prenanthi*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**,2013,4(35):1105-1110.
- [6] HOVDA M B,SIVERTSVIK M,LUNESTAD B T,et al. Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut(*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE[J]. **Food Microbiology**,2007,24(4):362-371.
- [7] WANG G H,CLARK C G,LIU C Y,et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. **Journal of Clinical Microbiology**,2003,41(3):1048-1054.
- [8] 相振田. 饲料不同来源淀粉对断奶仔猪肠道功能和健康的影响及机理研究[D]. 雅安:四川农业大学,2011.
- [9] BALCAZAR J L,VENDRELL D,BLAS I,et al. Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers[J]. **Journal of Medical Microbiology**,2007,56(4):323-328.
- [10] SONG Zengfu,WU Tianxing. Review on intestinal normal microflora in fish [J]. **Fisheries Science**,2007,26(8):471-474. (in Chinese)
- [11] WANG Xinfeng,LENG Qingwen,LI Zhiyuan,et al. Effects of oligosaccharides on rumen microflora of weanling lambs[J]. **Chinese Journal of Animal Nutrition**,2010,22(5):1396-1401. (in Chinese)
- [12] ZHENG Q R,WU Y L,XU H L. Effect of dietary oxidized konjac glucomannan on *Schizothorax prenanthi* growth performance, body composition,intestinal morphology and intestinal microflora [J]. **Fish Physiology and Biochemistry**,2015,41(3): 733-743.
- [13] DIMITROGLOU A,MERRIFIELD D L,SPRING P,et al. Effects of mannan oligosaccharide(MOS) supplementation on growth performance,feed utilization,intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. **Aquaculture**, 2010,300:182-188.
- [14] AKHTER N,WU B,MEMON A M,et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture:A review [J]. **Fish & Shellfish Immunology**,2015,45(2):733-741.
- [15] DANIELS C L,MERRIFIELD D L,BOOTHROYD D P,et al. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance,gut morphology and gut microbiota [J]. **Aquaculture**,2010,304(1):49-57.
- [16] CONNOLLY M L,LOVEGROVE J A,TUOHY K M. Konjac glucomannan hydrolysate beneficially modulates bacterial composition and activity within the faecal microbiota[J]. **Journal of Functional Foods**,2010(2):219-224.
- [17] KUHLEWEIN H,EMERY M J,RAWLING M D,et al. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2013,115(5):1091-1106.
- [18] DIMITROGLOU A,MERRIFIELD D L,MOATE R,et al. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. **Journal of Animal Science**,2009,87(10):3226-3234.