

文章编号:1000-0615(2009)05-0805-08

小麦基础饲料添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道菌群的影响

聂国兴^{1,2}, 华雪铭², 王俊丽¹, 明红³, 宋东莹¹, 周洪琪²

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453002;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 新乡医学院生命科学技术系, 河南 新乡 453003)

摘要:以尼罗罗非鱼[体重(100.39 ± 17.83) g]为实验对象,小麦基础饲料为对照,小麦基础饲料中分别添加不同水平的木聚糖酶(0.05%、0.10%、0.15%)作为实验饲料。每个处理设5个重复,每个重复放养40尾雄性尼罗罗非鱼。饱食投喂,饲养78 d后测定尼罗罗非鱼肠道细菌总量,并对需氧菌和厌氧菌进行鉴定,旨在研究木聚糖酶调控肠道菌群、促进尼罗罗非鱼生长的机理。结果表明,0.10%组和0.15%组前肠需氧菌数量显著低于对照组($P < 0.05$),0.05%组、0.10%组和0.15%组中肠需氧菌数量显著低于对照组($P < 0.05$)。实验组后肠需氧菌数量均显著低于对照组($P < 0.05$)。0.15%组前肠厌氧菌数量比对照组、0.05%组和0.10%组分别降低76.85% ($P < 0.05$)、75.62% ($P < 0.05$)、75.83% ($P < 0.05$)。0.10%组和0.15%组中肠厌氧菌数量显著低于对照组和0.05%组($P < 0.05$)。0.05%组、0.10%组和0.15%组后肠厌氧菌数量分别比对照组降低13.13% ($P > 0.05$)、48.30% ($P < 0.05$)、60.62% ($P < 0.05$)。小麦基础饲料中添加木聚糖酶,主要影响需氧菌 *Ent.*, *Bac.* 和厌氧菌 *Bact.*, *Bif.*, *Lac.* 的组成比例。0.05%组、0.10%组和0.15%组前肠 *Ent.* 比例较对照组分别降低13.16% ($P > 0.05$)、29.61% ($P < 0.05$)、49.34% ($P < 0.05$)。实验组前肠 *Bac.* 比例显著高于对照组($P < 0.05$)。0.10%组和0.15%组中肠、后肠 *Bac.* 比例显著高于对照组($P < 0.05$)。0.15%组前肠 *Lac.* 比例显著高于对照组和0.05%组($P < 0.05$)。对照组前肠 *Bact.* 比例显著高于0.10%组和0.15%组($P < 0.05$)。实验组中肠 *Bif.* 组成比例较对照组有显著提高($P < 0.05$)。0.15%组中肠 *Lac.* 比例显著高于对照组和0.05%组($P < 0.05$)。0.10%组和0.15%组中肠 *Bact.* 比例较对照组明显下降($P < 0.05$)。本研究认为,小麦基础饲料中添加木聚糖酶,可以调控尼罗罗非鱼肠道菌群,降低肠道致病菌 *Ent.* 和 *Bact.* 的组成比例,提高有益菌 *Bac.*, *Bif.* 和 *Lac.* 的组成比例。

关键词:尼罗罗非鱼;小麦基础饲料;木聚糖酶;肠道菌群

中图分类号:S 963.73

文献标识码:A

近年来,由于小麦生产科技水平的提高和人民群众膳食结构的改变,小麦出现了阶段性、结构性过剩,其在水产饲料中的应用正在越来越多地被养殖者尝试。但是,小麦中含有较多的木聚糖,特别是水溶性木聚糖是影响动物消化吸收的抗营养因子,限制了其作为主体能量饲料在水产饲料

工业中的应用,饲用木聚糖酶成功地解决了木聚糖的抗营养问题。研究表明,木聚糖酶可降低鱼类肠道食糜粘度,促进肠绒毛发育,提高消化酶活力,上调肠道葡萄糖转运载体表达,调控内分泌激素的合成与分泌,提高尼罗罗非鱼非特异性免疫功能^[1-3]。但木聚糖酶调控鱼类肠道菌群的研究

收稿日期:2008-12-24 修回日期:2009-04-01

资助项目:河南省重点科技攻关项目(092102210127);河南省自然科学基金研究项目(200510476015);河南省动物学重点学科资助项目

通讯作者:周洪琪, Tel:021-61900416, E-mail: hqzhou@shou.edu.cn

国内外尚未见研究报道。本研究在尼罗罗非鱼小麦基础饲料中添加不同水平的木聚糖酶,探讨尼罗罗非鱼肠道菌群数量与组成的变化,旨在从肠道微生态环境的变化阐明木聚糖酶消除木聚糖抗营养作用、促进尼罗罗非鱼生长的机理。

1 材料与方 法

1.1 实验设计

采用单因子浓度梯度法,在基础饲料中分别

添加 0.00%、0.05%、0.10%、0.15% 的木聚糖酶(河南师范大学动物营养学实验室提供,活力为 18 000 U/g)以不添加木聚糖酶的基础饲料组为对照,试验组和对照组各设 5 个平行。

1.2 实验饲料

基础饲料含有 50% 小麦(表 1),试验饲料用 HKJ-218 型环模制粒机制成 $\phi=2$ mm 的硬颗粒,自然晾干,备用。饲料成分及营养水平见表 1。

表 1 试验饲料组成及营养水平

Tab.1 Composition of the experimental diet and its nutrition level

饲料原料与营养素 raw material and nutrient of experimental diet	对照组 control group	试验组 test groups		
		0.05%	0.10%	0.15%
小麦(豫麦 34) wheat (Yumai 34)	50.00	50.00	50.00	50.00
大豆粕 soybean meal-solvent	23.00	23.00	23.00	23.00
棉籽粕 cottonseed meal-solvent	2.00	2.00	2.00	2.00
菜籽粕 rapessed meal-solvent	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼粉 fish meal	19.00	18.95	18.85	18.80
氯化胆碱 choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15
1.25% 预混料 1.25% premix	1.25	1.25	1.25	1.25
鱼油 fish oil	1.40	1.40	1.40	1.40
磷酸二氢钙 CaH_2PO_4	1.50	1.50	1.50	1.50
木聚糖酶 xylanase	0	0.05	0.10	0.15
水分 moisture	8.59	8.36	8.62	8.86
粗蛋白 crude protein	30.32	30.29	30.24	30.21
粗脂肪 crude fat	3.46	3.46	3.46	3.45
粗纤维 crude fiber	2.65	2.65	2.66	2.66
粗灰分 crude ash	4.94	4.93	4.92	4.92
有效磷 available phosphorate	0.97	0.97	0.96	0.96
赖氨酸 lysine	1.74	1.74	1.74	1.73
蛋氨酸 methionine	0.61	0.61	0.61	0.61
总木聚糖 total xylan	4.23	4.23	4.23	4.23
可溶性木聚糖 water-soluble xylan	1.05	1.06	1.05	1.05

注:每 1 000 g 1.25% 预混料含: VA 75×10^4 IU, VD₃ 15×10^4 IU, VE 14 g, VK₃ 325 mg, VB₁ 1 500 mg, VB₂ 1 250 mg, VB₆ 1 100 mg, VB₁₂ 4 mg, VC 2.5 g, 肌酸 5.5 g, 烟酸 4 g, 泛酸 4.5 g, 叶酸 70 mg, 生物素 125 mg, 胆碱 150 g, 镁 45 g, 铁 15 g, 铜 0.35 g, 锌 3 g, 锰 1.5 g, 碘 50 mg, 硒 9 mg, 钴 11 mg, 磷 105 g, 钙 330 g

Notes: premix includes(per 1 000 g): VA 75×10^4 IU, VD₃ 15×10^4 IU, VE 14 g, VK₃ 325 mg, VB₁ 1 500 mg, VB₂ 1 250 mg, VB₆ 1 100 mg, VB₁₂ 4 mg, VC 2.5 g, creatine 5.5 g, nincia 4 g, pantothenic acid 4.5 g, folic acid 70 mg, biotin 125 mg, choline chloride 150 g, Mg 45 g, Fe 15 g, Cu 0.35 g, Zn 3 g, Mn 1.5 g, I 50 mg, Se 9 mg, Co 11 mg, P 105 g, Ca 330 g

1.3 饲养管理

实验尼罗罗非鱼来自农业部中捷罗非鱼良种场(河北沧州)。饲养于 20 只 1.0 m × 1.0 m × 1.3 m 的池塘浮式网箱中,随机分组。每个网箱放养 40 尾雄性尼罗罗非鱼,初始体重为 (100.39 ± 17.83) g。实验采用饱食方式,每天投喂 4 次(8:30、11:30、14:30、17:30)。实验期间水温为 (28.69 ± 3.12) °C,各组水质完全一致。每

周刷洗网箱 1 次,防止藻类附着生长。实验时间共计 78 d。

1.4 菌悬液制备

摄食后 2 h,每只网箱随机取 1 尾实验鱼,每个处理 5 尾。体表用 70% 的酒精消毒后,从肛门剪开,掀起腹壁,露出肠道。分离出前、中、后肠(食道后至肠管的第一个弯曲点为前肠,第一个弯曲点至最后一个弯曲点为中肠,最后一个弯曲

点至肛门为后肠),分别剪取约 2 cm² 的肠壁。用无菌生理盐水(0.65% NaCl 溶液)淋洗肠壁 3 次,再用无菌水漂洗一次,用剪刀剪碎,放入灭菌的匀浆器中匀浆,准确移取 0.5 g 匀浆物,加 4.5 mL 无菌生理盐水,即为 10⁻¹ 菌悬液。将上述菌悬液进行 10 倍系列梯度稀释至 10⁻⁶。

1.5 平板培养及计数

取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3 种浓度的菌悬液 50 μL 涂布于 FWA(淡水琼脂培养基)平板上,每个浓度涂 6 个平板,其中 3 个平板 30 °C、有氧培养 24 ~ 48 h;另外 3 个平板置于厌氧工作站(BUG BOX Anaerobic Workstation)中,30 °C 培养 48 ~ 72 h,至平板长出明显的菌落后结束培养。选择菌落清晰、分散且菌落数在 30 ~ 300 的平板计数,换算成每克肠壁所含细菌数量。

1.6 斜面培养、鉴定

从每个处理的前、中、后肠有氧培养平板上各挑取 250 个单菌落,分别接种于 FWA 斜面上,恒温培养箱中 30 °C 培养 8 ~ 12 h,培养结束后,斜面置 4 °C 冰箱中保存。存放时间较长的斜面,鉴定前要进行转接活化。需氧菌鉴定参照《一般细菌常用鉴定方法》^[4]和《伯杰细菌鉴定手册》^[5]。

从每个处理的前、中、后肠厌氧培养平板上各挑取 150 个单菌落,分别接种于 FWA 斜面上,厌氧工作站中 30 °C 培养 24 ~ 36 h,采用 VITEK-II 型全自动微生物分析系统和 VITEK-ANA 厌氧菌

鉴定板,4 h 内完成鉴定。

1.7 数据处理

采用 SPSS 11.5 进行 one-way ANOVA 分析和 LSD 比较。结果以平均数 ± 标准差(mean ± SD)表示。

2 结果

2.1 尼罗罗非鱼肠道细菌数量

需氧菌 对照组前、中、后肠的需氧菌数量分别为 29.14 × 10⁶ CFU/g、55.33 × 10⁶ CFU/g、117.00 × 10⁶ CFU/g(表 2)。对前肠需氧菌数量分析可知,0.10% 组、0.15% 组显著低于对照组($P < 0.05$);0.05% 组、0.10% 组和 0.15% 组中肠需氧菌数量较对照组均显著降低($P < 0.05$);3 个实验组后肠的需氧菌数量均显著低于对照组($P < 0.05$)。后肠需氧菌数量明显高于同一处理前肠和中肠的需氧菌数量。

厌氧菌 0.15% 组前肠厌氧菌数量为 2.75 × 10⁶ CFU/g,较对照组、0.05% 组和 0.10% 组分别降低 76.85% ($P < 0.05$)、75.62% ($P < 0.05$)、75.83% ($P < 0.05$)。0.10% 组和 0.15% 组中肠厌氧菌数量分别为 11.20 × 10⁶ CFU/g 和 8.66 × 10⁶ CFU/g,显著低于对照组和 0.05% 组($P < 0.05$);0.05% 组、0.10% 组和 0.15% 组后肠厌氧菌数量分别比对照组降低 13.13% ($P > 0.05$)、48.30% ($P < 0.05$)、60.62% ($P < 0.05$)。

表 2 饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道细菌数量的影响

Tab.2 Effects of xylanase on the numbers of the bacteria in intestinal of *Oreochromis niloticus*

细菌 bacterium	部位 sites	× 10 ⁶ CFU/g			
		对照组 control	0.05% 组 0.05% xylanase	0.10% 组 0.10% xylanase	0.15% 组 0.15% xylanase
需氧菌 aerobic bacteria	前肠 fore-gut	29.14 ± 11.08 ^a	25.07 ± 5.81 ^{ab}	17.83 ± 7.33 ^b	4.67 ± 2.42 ^c
	中肠 mid-gut	55.33 ± 23.88 ^a	35.83 ± 14.73 ^b	21.67 ± 11.96 ^{bc}	16.00 ± 4.19 ^c
	后肠 hind-gut	117.00 ± 23.36 ^a	52.33 ± 13.52 ^b	34.93 ± 4.91 ^b	27.83 ± 10.09 ^c
厌氧菌 anaerobic bacteria	前肠 fore-gut	11.88 ± 2.82 ^a	11.28 ± 3.50 ^a	11.38 ± 3.41 ^a	2.75 ± 0.96 ^b
	中肠 mid-gut	21.94 ± 4.62 ^a	19.72 ± 4.23 ^a	11.20 ± 3.70 ^b	8.66 ± 5.34 ^b
	后肠 hind-gut	27.58 ± 8.16 ^a	23.96 ± 6.24 ^a	14.26 ± 4.18 ^b	10.86 ± 2.66 ^b

注:同一行字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Notes: Different letters in the same line indicate difference at $P < 0.05$ among treatments

2.2 尼罗罗非鱼肠道细菌组成

需氧菌 本研究共鉴定了尼罗罗非鱼肠道中 12 个科(属)的需氧菌(表 3)。Ent., Bac., Aer. 和 Vib. 为前肠优势需氧菌。木聚糖酶主要影

响前肠 Ent., Bac., Alc. 和 Mor./Aci. 的组成比例,而对 Aer., Cor., Mic., Stu., Pse., Vib. 等 6 个属的组成无显著影响($P > 0.05$)。0.05% 组、0.10% 组和 0.15% 组前肠 Ent. 比例较对照组分别降低

13.16% ($P > 0.05$)、29.61% ($P < 0.05$)、49.34% ($P < 0.05$); 3个实验组前肠 *Bac.* 比例显著高于对照组 ($P < 0.05$); 0.15%组 *Alc.* 比例、*Mor./Aci.* 比例显著高于对照组、0.05%组和0.10%组 ($P < 0.05$)。

中肠 *Vib.* 组成比例较前肠大幅提高, 和 *Ent.*, *Bac.*, *Aer.* 一起, 成为尼罗罗非鱼中肠的优

势需氧菌。按组成比例, *Ent.* > *Aer.* > *Vib.* > *Bac.*。小麦基础饲料中添加木聚糖酶, 仅对尼罗罗非鱼中肠 *Bac.* 组成比例有显著影响, 0.10%组和0.15%组中肠的 *Bac.* 比例显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表3 饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道需氧菌组成的影响
Tab.3 Effects of xylanase on the composition of the aerobic bacteria in intestinal of *Oreochromis niloticus*

处理 treatments	部位 sites	肠杆菌科 <i>Ent.</i>	气单胞菌属 <i>Aer.</i>	棒杆菌属 <i>Cor.</i>	芽孢杆菌属 <i>Bac.</i>	微球菌属 <i>Mic.</i>	葡萄球菌属 <i>Sta.</i>	假单胞菌属 <i>Pse.</i>	产碱菌属 <i>Alc.</i>	弧菌属 <i>Vib.</i>	莫拉氏菌属/不动杆菌属 <i>Mor./Aci.</i>	其他 Oth.
对照组 control group	前肠 fore-gut	60.80 ± 5.93 ^a	12.40 ± 3.85	1.60 ± 1.67	2.80 ± 1.10 ^c	0.80 ± 1.10	1.20 ± 1.10	0.80 ± 1.10	1.20 ± 1.79 ^b	4.40 ± 2.61	2.80 ± 2.68 ^b	11.20 ± 3.90
	中肠 mid-gut	51.60 ± 11.61	19.20 ± 6.72	1.60 ± 1.67	2.40 ± 0.89 ^b	0.80 ± 1.10	1.20 ± 1.79	1.60 ± 1.67	1.20 ± 1.10	14.00 ± 3.74	2.80 ± 2.68	3.60 ± 2.61
	后肠 hind-gut	32.40 ± 10.71	30.40 ± 5.90 ^a	2.40 ± 1.67	2.80 ± 1.10 ^c	1.20 ± 1.79	2.00 ± 2.45	2.40 ± 2.61	1.60 ± 1.67 ^b	16.40 ± 6.54	6.00 ± 6.00	4.40 ± 4.10
0.05%组 0.05% xylanase	前肠 fore-gut	52.80 ± 6.42 ^a	12.40 ± 6.84	2.40 ± 2.19	11.20 ± 5.02 ^b	1.20 ± 1.79	1.20 ± 1.79	1.60 ± 1.67	1.60 ± 1.67 ^b	4.80 ± 2.61	3.20 ± 3.03 ^b	8.00 ± 2.83
	中肠 mid-gut	49.20 ± 7.69	19.20 ± 2.28	1.60 ± 1.67	8.80 ± 4.60 ^{ab}	0.40 ± 0.89	1.20 ± 1.79	1.60 ± 0.89	1.20 ± 1.79	13.20 ± 7.69	2.80 ± 3.03	1.60 ± 1.67
	后肠 hind-gut	36.40 ± 6.54	19.60 ± 5.18 ^b	2.40 ± 0.89	6.40 ± 3.29 ^{bc}	1.60 ± 0.89	2.40 ± 1.67	2.80 ± 2.28	2.40 ± 0.89 ^b	16.40 ± 2.61	6.00 ± 4.24	4.80 ± 2.28
0.10%组 0.10% xylanase	前肠 fore-gut	42.80 ± 7.82 ^b	10.40 ± 5.90	3.20 ± 1.10	19.60 ± 2.61 ^a	1.20 ± 1.79	1.20 ± 1.79	1.20 ± 1.79	3.20 ± 1.79 ^b	4.80 ± 2.28	3.20 ± 3.03 ^b	9.20 ± 1.79
	中肠 mid-gut	42.80 ± 13.16	17.60 ± 2.61	2.80 ± 3.35	14.00 ± 7.48 ^a	0.80 ± 1.10	0.80 ± 1.10	0.80 ± 1.10	2.40 ± 3.58	14.00 ± 6.16	2.00 ± 3.46	2.40 ± 3.29
	后肠 hind-gut	33.60 ± 12.28	14.40 ± 6.23 ^{bc}	4.40 ± 2.19	13.20 ± 6.42 ^{ab}	2.40 ± 1.67	1.60 ± 1.67	2.00 ± 2.45	5.20 ± 3.90 ^{ab}	13.60 ± 4.77	6.00 ± 4.24	5.20 ± 2.28
0.15%组 0.15% xylanase	前肠 fore-gut	30.80 ± 7.43 ^c	11.60 ± 5.90	4.00 ± 2.00	21.20 ± 6.10 ^a	2.00 ± 2.00	0.80 ± 1.10	2.80 ± 1.10	6.40 ± 1.67 ^a	6.80 ± 3.03	8.00 ± 2.00 ^a	9.60 ± 1.67
	中肠 mid-gut	34.00 ± 11.66	18.80 ± 8.32	2.00 ± 2.45	17.60 ± 7.40 ^a	1.20 ± 1.10	0.80 ± 1.10	1.60 ± 1.67	4.00 ± 4.90	12.80 ± 5.02	4.00 ± 5.10	3.20 ± 2.28
	后肠 hind-gut	33.20 ± 15.07	10.00 ± 4.69 ^c	3.20 ± 1.10	15.60 ± 7.40 ^a	2.40 ± 0.89	1.20 ± 1.10	2.80 ± 2.28	5.60 ± 1.67 ^a	10.80 ± 3.03	7.20 ± 2.68	9.60 ± 3.85

注:同一列、同一部位字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: Different letters in the same list and in the same site indicate difference at $P < 0.05$ among treatments, The same follow

后肠优势菌包括 *Ent.*, *Aer.*, *Vib.* 和 *Bac.*, 按组成比例排序, *Ent.* > *Aer.* > *Vib.* > *Bac.*, 和中肠较为相似。木聚糖酶显著影响 *Aer.*, *Bac.* 和 *Alc.* 3个属的组成比例; 3个实验组后肠 *Aer.* 比例均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 0.10%组和0.15%组后肠 *Bac.* 比例显著高于对照组 ($P <$

0.05); 0.15%组后肠 *Alc.* 组成比例较对照组、0.05%组有显著提高 ($P < 0.05$)。

厌氧菌 采用 VITEK-ANA 厌氧菌鉴定板, 鉴定了尼罗罗非鱼前、中、后肠 3个属的厌氧菌, 即: *Bif.*, *Lac.* 和 *Bact.*。结果表明, *Bact.* 在尼罗罗非鱼肠道中占绝对优势, 按照组成比例排序,

前、中、后肠均为 *Bact.* > *Bif.* > *Lac.* (表 4)。

木聚糖酶虽能提升实验组尼罗罗非鱼前肠 *Bif.* 比例,但各处理之间无显著差异 ($P > 0.05$)。0.15% 组前肠 *Lac.* 比例显著高于对照组和 0.05% 组 ($P < 0.05$)。与 *Bif.*、*Lac.* 的变化趋势相反,随着木聚糖酶添加量的提高,前肠 *Bact.* 显著下降;对照组 *Bact.* 显著高于 0.10% 组和 0.15%

组 ($P < 0.05$)。

实验组中肠 *Bif.* 组成比例较对照组有显著提高 ($P < 0.05$)。0.15% 组中肠 *Lac.* 比例显著高于对照组和 0.05% 组 ($P < 0.05$)。实验组中肠 *Bact.* 比例均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼后肠厌氧菌组成无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 4 饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道厌氧菌组成的影响
Tab. 4 Effects of xylanase on the composition of the anaerobic bacteria in intestinal of *Oreochromis niloticus*

处理 treatments	部位 sites	双歧杆菌属 <i>Bif.</i>	乳酸杆菌属 <i>Lac.</i>	拟杆菌属 <i>Bact.</i>	其它 Oth.	%
对照组 control group	前肠 fore-gut	6.67 ± 5.27	10.67 ± 2.79 ^b	65.33 ± 10.17 ^a	17.33 ± 6.41	
	中肠 mid-gut	12.00 ± 8.03 ^b	15.33 ± 3.80 ^b	59.33 ± 9.83 ^a	12.00 ± 5.05	
	后肠 hind-gut	19.33 ± 9.83	14.00 ± 2.79	45.33 ± 14.64	21.33 ± 5.58	
0.05% 组 0.05% xylanase	前肠 fore-gut	19.33 ± 8.63	12.67 ± 2.79 ^b	52.67 ± 14.02 ^{ab}	15.33 ± 6.91	
	中肠 mid-gut	24.67 ± 7.30 ^a	19.33 ± 2.79 ^b	44.67 ± 9.60 ^b	11.33 ± 5.58	
	后肠 hind-gut	22.00 ± 9.89	15.33 ± 2.98	42.00 ± 8.69	20.67 ± 3.66	
0.10% 组 0.10% xylanase	前肠 fore-gut	18.67 ± 10.70	18.00 ± 6.91 ^{ab}	45.33 ± 11.20 ^b	18.00 ± 9.60	
	中肠 mid-gut	26.00 ± 7.60 ^a	23.33 ± 3.34 ^{ab}	40.66 ± 10.11 ^b	10.00 ± 4.08	
	后肠 hind-gut	22.00 ± 10.17	17.33 ± 5.48	40.00 ± 9.43	20.67 ± 4.95	
0.15% 组 0.15% xylanase	前肠 fore-gut	19.33 ± 10.11	21.33 ± 6.06 ^a	44.00 ± 6.41 ^b	15.33 ± 11.20	
	中肠 mid-gut	26.00 ± 9.83 ^a	26.67 ± 2.36 ^a	38.00 ± 5.05 ^b	9.33 ± 3.65	
	后肠 hind-gut	23.33 ± 9.72	6.06 ± 2.71	36.67 ± 6.23	21.33 ± 3.80	

3 讨论

3.1 肠道菌群的数量、组成与分布

鱼类的肠道中有大量的微生物,它们在长期的历史进化过程中形成了一个动态的微生物生态系统。这些菌群为鱼类创造着生存的微环境,同时鱼类也为它们提供生长的条件。影响鱼类肠道菌群数量的因素很多,主要有鱼的种类^[6]、发育阶段^[7-9]、饲料成分^[9-12]、摄食状况^[13]、水体环境^[11]、生理状态^[14]、肠道组织形态^[15]、饲料在肠道中的停留时间^[16]等。Sugita 等^[17]研究发现,淡水鱼类肠道内细菌数量在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ CFU/g,与本实验测得尼罗罗非鱼肠道菌群数量为 $2.36 \times 10^7 \sim 8.76 \times 10^7$ CFU/g,其中需氧菌 $2.05 \times 10^7 \sim 6.72 \times 10^7$ CFU/g,厌氧菌 $0.74 \times 10^7 \sim 1.62 \times 10^7$ CFU/g^[17] 的研究结果一致。本研究对照组的食糜黏度较高,在消化道中停留时间较长,延迟了细菌群落的迁移,为细菌的生长和繁殖提供了一个稳定的环境,肠道中各种细菌数量大大增加。添加木聚糖酶后,上述效应减弱或消失,肠道中细菌数量降低。

不同鱼类肠道菌群的组成不同。Sugita 等^[18]研究指出,*Vib.*、*Aer.* 是淡水鱼类胃肠道中主要的兼性厌氧菌,A型和B型 *Bact.* 是其主要的专性厌氧菌。蔡雪峰等^[11]对虹鳟的研究表明,虹鳟肠道中的需氧菌和兼性需氧菌主要是 *Mic.*、*Cor.*、*Aci.*、*Aer.*、*Sta.*、*Ent.*、*Bac.* 和 *Pse.* 9 个属。本研究得到相似的结果,*Ent.*、*Bac.* 和 *Aer.* 是尼罗罗非鱼前肠的优势需氧菌,*Ent.*、*Aer.*、*Vib.* 和 *Bac.* 是中、后肠的优势需氧菌;*Bact.*、*Bif.*、*Lac.* 为前、中、后肠的优势厌氧菌。哺乳动物肠道菌群中占优势的是 *Bact.* 和 *Bif.* 等厌氧菌,几乎占有所有被分离活菌的 99%,而需氧菌所占比例不超过 1%^[19]。本研究尼罗罗非鱼肠道的需氧菌约为厌氧菌的 2.77 ~ 4.15 倍。这可能与鱼的生物特性,特别是消化道对食物的利用特性与哺乳动物不同有关。

3.2 肠道菌群的营养调控及相互关系

木聚糖酶通过改变尼罗罗非鱼肠道氧环境与微生物氧化类型,调控肠道菌群的数量与组成。本实验对照组食糜黏度较高,在消化道中形成了较多的局部无氧环境,此时,肠道中微生物的生物氧化以糖酵解途径 (EMP) 为主,产生丙酮酸

量较少,以丙酮酸为原料,进行同型和异型乳酸发酵的 *Lac.* 菌群、进行异型乳酸发酵的 *Bif.* 菌群代谢活动较低,处于劣势;同时肠道内微生物总体发酵活动旺盛,形成较多发酵产物,如延胡索酸,以延胡索酸进行呼吸的 *Ent.* 和 *Bact.* 代谢活动处于优势,个体大量增殖。添加木聚糖酶后,肠道中的局部无氧环境得到缓解,肠道内总的发酵活动减弱,发酵产物延胡索酸减少,*Ent.* 和 *Bact.* 的代谢活动下降;此时肠道中微生物的生物氧化不仅有 EMP 途径,还有戊糖磷酸途径(HMP)和 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸途径(ED)^[20],其中具有 HMP 途径的微生物可以直接利用木糖。在这种情况下,实验组尼罗罗非鱼肠道中产生丙酮酸的量较对照组将明显增加,这使得以丙酮酸为原料的 *Bif.* 和 *Lac.* 菌群发酵处于优势,两种菌群的代谢活动旺盛,个体获得增殖。和 *Ent.*、*Bact.*、*Bif.*、*Lac.* 4 种菌群的消长原因不同,随着木聚糖酶添加量的提高,肠道局部有氧环境增多,可能是 *Bac.*、*Alc.*、*Mor.* / *Aci.* 4 个属的菌群获得增殖的主导原因。另外,木聚糖酶通过改变尼罗罗非鱼肠道的食糜粘度,改变了肠道环境和肠道菌群之间原有的渗透压平衡^[19],也可能是肠道菌群发生变化的原因之一。

木聚糖的降解产物参与肠道菌群调控。木聚糖酶促进饲料中的木聚糖降解,降解产物为低聚木糖(木寡糖)和木糖,以低聚木糖为主。低聚木糖可显著降低动物肠道有害菌,如 *Ent.*、*Fus.* (梭杆菌属)数量,增加 *Bif.* 和 *Lac.* 数量^[21]。低聚糖能促进动物肠道有益菌增殖已为众多研究者认同^[22-23]。本实验中,*Ent.*、*Bact.* 比例下降,*Bac.*、*Bif.*、*Lac.* 比例上升,可能与食糜中低聚木糖含量增加有关。首先,由于分子间结合位置及结合类型的特殊性,低聚木糖不能被动物自身分泌的消化酶分解,而病原菌,如 *Ent.* 等也不能利用低聚木糖,但可被肠道中 *Bac.*、*Bif.*、*Lac.* 分泌的糖苷酶水解,促进 *Bac.*、*Bif.*、*Lac.* 增殖。其次,低聚木糖可以和 *Ent.*、*Bact.* 等病原菌的外源凝集素特异性结合,使其无法在肠壁上粘附,随着低聚木糖排出体外。动物消化道内病原菌,如 *Ent.* 等,细胞表面或绒毛上具有类丁质结构(外源凝集素),它能识别动物肠壁细胞上的特异性糖类受体,并与之结合,在肠壁上繁殖,导致肠道疾病的发生。低聚木糖与肠壁上的特异性糖类受体具有相似结

构,它与病原菌表面的类丁质也有很强的结合力,可以竞争性地与病原菌结合,使其无法定植在肠壁上,结合后的低聚木糖不能提供病原菌生长所需的营养素,致使病原菌死亡^[24]。本实验结果与蔡雪峰等^[11]、Lv 等^[12] 等对虹鳟和奥尼罗非鱼的研究结果较为一致。

小麦基础饲料中添加木聚糖酶后,*Bac.* 在前、中、后肠中大量增殖,是肠道 *Ent.*、*Bact.* 菌群减少,*Bif.*、*Lac.* 菌群增多的另一重要原因。大量研究表明,*Bac.* 可以使有益菌群增殖,产生蛋白类拮抗物质,抑制肠道病原细菌滋生^[25-26]。王红宁等^[27]、陈勇等^[28] 在鲤饲料中添加 *Bac.* 后,肠道中 *Bif.*、*Lac.* 增多,*Ent.*、*Aer.* 数量减少,分析原因是,*Bac.* 和 *Lac.* 可产生乳酸和挥发性脂肪酸等抗性物质,影响肠道内致病菌的生长与繁殖。*Lac.* 的所有种基本上都可以产生细菌素,抑制 *Ent.* DNA 合成,是 *Lac.* 和 *Ent.* 组成比例此消彼涨的又一重要原因。

河南省水产科学研究院张玲硕士、河南师范大学王海磊博士,河南师范大学 2003 届毕业生付天玺、王军成参与部分实验,谨致谢意。

参考文献:

- [1] 聂国兴,王俊丽,朱命炜,等. 小麦基础饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道食糜粘度和绒毛、微绒毛发育的影响[J]. 水产学报,2007,31(1):54-61.
- [2] 聂国兴,王俊丽,华雪铭,等. 木聚糖酶对尼罗罗非鱼钠葡萄糖共转运载体(SGLT1)mRNA 表达的影响[J]. 水产学报,2007,31(6):765-770.
- [3] 聂国兴,王俊丽,周洪琪. 饲料中添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼生长及血清激素水平的影响[J]. 中国水产科学,2007,14(2):249-256.
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.
- [5] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第八版. 北京:科学出版社,1984.
- [6] 李可俊,管卫兵,徐晋麟,等. PCR-DGGE 对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究[J]. 中国微生态学杂志,2007,19(3):268-269,272.
- [7] Refetie S, Landsverk T, Bakke-Mckellep A, et al. Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod

- (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal[J]. *Aquaculture*, 2006, 261:269 – 284.
- [8] Verner-Jeffreys D W, Shields R J, Bricknell I R, *et al.* Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries [J]. *Aquaculture*, 2003, 219:21 – 42.
- [9] Ringo E, Olsen R E, Mayhew T M, *et al.* Electron microscopy of the intestinal microflora of fish[J]. *Aquaculture*, 2003, 227:395 – 415.
- [10] Hu C H, Xu Y, Xia M S, *et al.* Effects of Cu^{2+} – exchanged montmorillonite on growth performance, microbial ecology and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 270:200 – 206.
- [11] 蔡雪峰, 罗琳, 战文斌, 等. 壳聚糖对虹鳟鱼肠道菌群影响的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(4):606 – 610.
- [12] Lv H Y, Zhou Z G, Rudeaux F, *et al.* Effects of dietary short chain fructo oligosaccharides on intestinal microflora, mortality and growth performance of *Oreochromis aureus* ♂ × *O. niloticus* ♀ [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, 19(6):691 – 697.
- [13] 吴尚忠(译). 鱼类消化生理[M]. 上海:上海科学与技术出版社, 1983.
- [14] 蒋长苗, 鲍传和, 马元山. 草鱼肠道正常菌群与肠炎病原菌关系的初步研究[J]. *吉林农业大学学报*, 1992, 14(1):55 – 58
- [15] Trust T J, Sparrow R A H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater Salmonoid fishes [J]. *Can J Microbiol*, 1974, (20):1219 – 1228.
- [16] 陈孝焯. 草鱼鱼种饱食及空肠状态下肠道细菌数量变化的研究[J]. *水利渔业*, 1996, 6:18 – 19.
- [17] Sugita H, Oshima K, Tamura M. Bacterial flora in the gastrointestinal of freshwater fishes in the river [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1983, 49(9):1387 – 1395.
- [18] Sugita H, Fushino T, Oshima K, *et al.* Microflora in the water and sediment of freshwater culture ponds[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1985, 51(1):91 – 97.
- [19] 黄秀梨, 许宝孝, 袁生, 等. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2003.
- [20] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社, 2002.
- [21] Xu Z R, Zou X T, Hu C H, *et al.* Effects of dietary fructo-oligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of growing pigs[J]. *Asi Aus J Animal Science*, 2002, 15(12):1784 – 1789.
- [22] Michael B. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora [J]. *European Journal of Nutrition*, 2002, 41(suppl):11 – 16.
- [23] Manning T, Gibson G R. Prebiotics [J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2004, 18(2):287 – 298.
- [24] 刘文斌, 尹君, 方星星, 等. 3种益生菌配伍对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)生长、消化及肠道菌群组成的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(1):29 – 35.
- [25] Sugita H, Hirose Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish [J]. *Aquaculture*, 1998, 165:3 – 4.
- [26] Rengpipat S, Rukpratanpom S, Piyatirrtivorakul S. Immunity enhancement in black tiger shrimp by a probiont bacterium[J]. *Aquaculture*, 2000, 191:271 – 288.
- [27] 王红宁, 胡延秀, 何明清, 等. 微生物添加剂饲喂鲤鱼肠道菌群的变化研究[J]. *四川农业大学学报*, 1994, 12:654 – 657.
- [28] 陈勇, 黄权, 李月红, 等. 溢康素对鲤鱼肠道菌群生长的影响[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2001, 2(5):441 – 445.

The influences of xylanase added in wheat basal diet on intestinal microflora of *Oreochromis niloticus*

NIE Guo-xing^{1,2}, HUA Xue-ming², WANG Jun-li¹,
MING Hong³, SONG Dong-ying¹, ZHOU Hong-qi²

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The purpose of adding xylanase to wheat basal diet in this paper was to study the influences of xylanase on the quantity and composition of intestinal microflora, display the mechanism of xylanase promoting *Oreochromis niloticus* growth. *Oreochromis niloticus* were used as experiment objects in this study and their initial body weight was (100.39 ± 17.83) g. Wheat basal diet was control. The tested diets were wheat basal diet added with different levels of xylanase (0.05%, 0.10%, and 0.15% respectively). Each treatment was devised with 5 repeats and each repeat had 40 male *Oreochromis niloticus*. The fish in floating cages were fed to satiation for 78 days. In this paper, we measured the amount of bacteria in intestinal of *Oreochromis niloticus*. Anaerobic bacteria were identified by BIOMERIEUX VITEK- II Automated Identification Systems and VITEK-ANA ID Kit. The results showed that the quantity and composition of intestinal microflora of *Oreochromis niloticus* were changed by dietary xylanase to wheat basal diets. The fore-gut quantity of aerobic bacteria of 0.10% and 0.15% xylanase groups were significantly lower than that of the control ($P < 0.05$ respectively). The mid-gut quantity of aerobic bacteria of 0.05%, 0.10% and 0.15% xylanase groups were significantly lower than that of the control ($P < 0.05$ respectively). The hind-gut quantity of aerobic bacteria of the test groups were lower significantly than that of the control ($P < 0.05$). The fore-gut quantity of anaerobic bacteria of 0.15% xylanase group was decreased by 76.85%, 75.62% and 75.83% compared with those of the control, 0.05% and 0.10% groups ($P < 0.05$ respectively). The mid-gut quantity of anaerobic bacteria of 0.10% and 0.15% xylanase groups were lower significantly than those of the control and 0.05% xylanase group ($P < 0.05$). The hind-gut quantity of anaerobic bacteria of 0.05%, 0.10% and 0.15% xylanase groups were decreased by 13.13%, 48.30% and 60.62% compared with that of the control ($P > 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$ respectively). The xylanase mainly influenced the proportion of *Ent.*, *Bac.*, *Bact.*, *Bif.* and *Lac.*. The proportion of fore-gut *Ent.* of 0.05%, 0.10% and 0.15% xylanase groups were decreased by 13.16%, 29.61% and 49.34% compared with that of the control ($P > 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$ respectively). The proportion of fore-gut *Bac.* of three test groups were significantly higher than that of the control ($P < 0.05$). The proportion of *Bac.* in mid-gut and hind-gut of 0.10% and 0.15% xylanase groups were higher than those of the controls ($P < 0.05$). The proportion of fore-gut *Lac.* of 0.15% xylanase group was significantly higher than those of the control and 0.05% xylanase group ($P < 0.05$ respectively). The proportion of fore-gut *Bact.* of the control was significantly higher than those of 0.10% and 0.15% groups ($P < 0.05$ respectively). The proportion of mid-gut *Bif.* of test groups were increased significantly compared with that of the control ($P < 0.05$). The proportion of mid-gut *Lac.* of 0.15% xylanase group was significantly higher than those of the control and 0.05% xylanase group ($P < 0.05$). The proportion of mid-gut *Bact.* of 0.10% and 0.15% xylanase groups were decreased significantly compared with that of the control ($P < 0.05$).

Key words: *Oreochromis niloticus*; wheat basal diet; xylanase; intestinal microflora