

甘露寡糖对罗非鱼幼鱼肠道微生物的影响

马相杰¹ 汪立平^{1*} 赵勇¹ 冷向军²

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

(2. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 200090)

摘 要: 分两个实验考察了饲料中添加自制酵母甘露寡糖、外购甘露寡糖和黄霉素对奥尼罗非鱼幼鱼[(1.00 ± 0.04) g]肠道菌群的影响。传统菌落计数结果表明, 不同的添加剂都能明显地改变幼鱼肠道中的乳酸杆菌和大肠杆菌的数量及比例, 其中 0.5% 自制酵母甘露寡糖使乳酸杆菌的数量增加 10.77% ($P < 0.05$), 大肠杆菌的数量减少 14.80% ($P < 0.05$), 使乳酸杆菌与大肠杆菌的比例提高到 0.9720。DGGE 图谱分析表明, 自制酵母甘露寡糖、外购甘露寡糖、黄霉素的加入都改变了罗非鱼幼鱼原有的肠道微生物的微生态环境, 其中自制酵母甘露寡糖对罗非鱼幼鱼肠道微生物的微生态影响最大。

关键词: 罗非鱼, 甘露寡糖, 黄霉素, 肠道菌群, DGGE

Effects of Mannan-oligosaccharides on Intestinal Microorganisms of *Tilapia* Larvae

MA Xiang-Jie¹ WANG Li-Ping^{1*} ZHAO Yong¹ LENG Xiang-Jun²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The effects of mannan-oligosaccharides and flavomycin on the intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae [(1.00 ± 0.04) g] were studied. The results showed that the number and ratio of *Lactobacillus* and *E. coli* in the intestinal tract of *Tilapia* larvae were obviously affected by three different additives including self-made yeast mannan-oligosaccharides, purchased mannan-oligosaccharides and flavomycin with different concentrations by plate count method. Among these additives, 0.5% self-made yeast mannan-oligosaccharides increased the *Lactobacillus* by 10.77% ($P < 0.05$), but reduce *E. coli* by 14.80% ($P < 0.05$), which increased the ratio of *Lactobacillus* and *E. coli* to 0.9720. Furthermore, the Denatured Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) fingerprints demonstrated that the original intestinal microbial microecology of *Tilapia* larvae was changed by all additives, among the three additives, self-made yeast mannan-oligosaccharides had the most significant influence on the intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae.

Keywords: *Tilapia*, Mannan-oligosaccharides, Flavomycin, Intestinal microorganisms, DGGE

甘露寡糖不仅具有低热、稳定、安全、无毒等良好的理化性质,还具有调整肠道和提高免疫力等保健功能。近年来研究发现,在猪^[1-2]、肉鸡^[3]、牛^[4-6]等畜禽饲料中添加甘露寡糖能明显改善胃、肠道微生态环境,促进乳酸杆菌等有益菌的增殖,抑制大肠杆菌的增殖,大大降低了腹泻率。目前,在鱼类饲料中添加甘露寡糖的研究较少,仅见鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[7]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[8]等少数品种。由甘露寡糖在饲料中的应用效果来看,甘露寡糖是抗生素的理想替代品。

罗非鱼是我国重要的出口水产品,其安全性和抗生素的替代品研究尤为受到关注。除红罗非鱼外,目前尚未见甘露寡糖在罗非鱼饲料中应用的研究报道。因此,本实验以奥尼罗非鱼幼鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. ureus*)为研究对象,通过在饲料中添加不同水平的自制酵母甘露寡糖,并与饲料中添加购买的外购甘露寡糖、黄霉素作比较,利用传统菌落计数法和变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)考察在罗非鱼幼鱼鱼体生长过程中对罗非鱼幼鱼肠道菌群的影响,为甘露寡糖在奥尼罗非鱼幼鱼上的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 自制酵母甘露寡糖的制备: 取实验室保藏产甘露聚糖酶菌株制备粗酶液^[9]。使用粗酶液水解酵母细胞壁制备酵母甘露寡糖^[10],烘干后制成粉末备用。自制酵母甘露寡糖的含量为 6.06%。外购甘露寡糖中有效甘露寡糖的含量为 12% (厂家报道)。

1.1.2 实验用鱼: 采用平均体重(1.00 ± 0.04) g 奥尼罗非鱼。选用规格一致,体格健壮个体。随机分配于池中,每池 70 尾鱼,饲养 60 d。

1.1.3 试剂: 培养基: 伊红美兰琼脂(EMB)北京路桥技术有限责任公司; MRS 琼脂(MRSA)北京路桥技术有限责任公司。

PCR 引物^[11]: DGGE-PCR 引物: V₃₋₂(5'-ACC GCGGCTGCTGG-3'); V₃₋₃(5'-CGCCCGCCGCGCGC GGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTAC GGGAGGCAGCAG-3')。

1.2 方法

1.2.1 养鱼实验设计: 实验 I: 在基础饲料中分别

添加 0.0% (对照组)、0.25%、0.50%、0.75% 自制酵母甘露寡糖(等量减少麦麸用量),共 4 个处理组,每处理 3 个重复。各种原料均过 60 目筛,搅拌均匀,挤压机制成直径 2.0 mm 的半沉性颗粒饲料。基础饲料组成见表 1。

实验 II: 在基础饲料中分别添加 0.0% 自制甘露寡糖(对照组)、添加 0.5% 自制甘露寡糖、0.5% 外购甘露寡糖、8 μg/g 的黄霉素。各种原料过 60 目筛。基础饲料组成见表 1。

表 1 基础饲料组成 Table 1 Fundamental ingredients of feed			
成分 Ingredients	比例 Proportion (%)	成分 Ingredients	比例 Proportion (%)
鱼粉 Fish meal	9.00	微量矿物元素预混料 Trace mineral elements premix	0.50
豆粕 Soybean meal	20.00	维生素预混料 Vitamin premix	0.25
菜籽粕 Rapeseed meal	24.00	氯化胆碱 Choline chloride	0.30
棉籽粕 Cottonseed meal	10.00	豆油 Bean oil	1.00
次粉 Wheat mid- dlings	21.45	鱼油 Fish oil	1.50
麦麸 Wheat bran	10.20	磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.80
总计 Total			100.00

注: 维生素预混料和微量元素预混料在每千克饲料添加量为 (μg/g): V_A: 6000 IU; V_D: 2000 IU; V_E: 50; V_K: 5; V_{B1}: 15; V_{B2}: 15; V_{B3}: 25; V_{B5}: 30; V_{B6}: 10; V_{B7}: 0.2; V_{B11}: 3; V_{B12}: 0.03; 肌醇: 100; V_C: 100; Zn: 80; Fe: 150; Cu: 4; Mn: 20; I: 0.4; Co: 0.1; Se: 0.1; Mg: 100.

Note: The amount of vitamin premix and trace mineral elements premix added in the feed (μg/g): V_A: 6000 IU; V_D: 2000 IU; V_E: 50; V_K: 5; V_{B1}: 15; V_{B2}: 15; V_{B3}: 25; V_{B5}: 30; V_{B6}: 10; V_{B7}: 0.2; V_{B11}: 3; V_{B12}: 0.03; Inositol: 100; V_C: 100; Zn: 80; Fe: 150; Cu: 4; Mn: 20; I: 0.4; Co: 0.1; Se: 0.1; Mg: 100.

1.2.2 实验管理: 实验 I: 实验鱼饲养于 12 个水泥池中(2.0 m × 1.5 m × 1.2 m),水深 0.6 m。用基础饲料驯化 1 周,待鱼摄食正常后开始实验,日投喂 4 次(8:00, 11:00, 14:00, 17:00),投饵率为体重 5%–10%,并根据水温、摄食情况进行调整,各组保持一致的投饲量。养殖实验期间水温 25℃–29℃,DO (溶解氧) > 5.0 mg/L、NH₃-N < 0.3 mg/L,昼夜充气。

实验 II: 饲养条件同实验 I。

1.2.3 大肠杆菌和乳酸杆菌的测定: 取实验 I、II

中奥尼罗非鱼的鱼肠道样品 0.5 g 放到灭菌处理的 10 mL 离心管中, 用无菌水倍比稀释一直到 10^{-7} 。用移液枪吸取适量稀释度的样品 100 μL , 接种到选择性培养基上, 用涂棒涂匀, 每个稀释度做 3 个平行样。在 37°C 条件下培养 48 h。培养结束后记数(每克鱼肠标本的活菌数), 取其平均值。剩余鱼肠放在 -20°C 下备用。

1.2.4 鱼肠道微生物总 DNA 的提取: 精确称取 100 mg 鱼肠道样品置于灭菌处理的 10 mL 离心管, 按照文献[12]提取肠道微生物总 DNA, 将提取的 DNA 样品放 -20°C 冷冻保存备用。

1.2.5 DNA 质量检测: 0.8% 琼脂糖、TAE Buffer 电泳, EB 染色, 凝胶成像仪观察分析。

1.2.6 PCR 扩增与变性梯度凝胶电泳(DGGE): 针对 16S rDNA V_3 区片段的 PCR 扩增, 扩增反应体系为 25 μL , 模板 DNA 加 50 ng。扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 2 min, 25 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像仪观察分析。PCR 产物进一步用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离。凝胶变性梯度为 35%–55%^[13], 电压为 120 V, 电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$, 60°C 电泳 3 h, 用 Sybergreen 染色后凝胶成像仪观察分析。

1.2.7 图像处理及数据分析: 利用 NTSYS 2.10 中的 UPGMA 做不同饲养条件下的肠道微生物菌群做聚类分析。以 R_f 值为标记, 对 DGGE 图谱条带采用二态编码, 即有条带存在的编码为“1”, 无条带存在的则编码为“0”, 利用 Jaccard^[14]系数对不同饲养条件

下的罗非鱼幼鱼肠道微生物菌群的相似性进行分析。

2 结果

2.1 实验 I 结果

对实验 I 鱼池中的鱼取鱼肠道, 测定鱼肠道中乳酸杆菌和大肠杆菌的数量如表 2 所示。

由表 2 可知, 3 个梯度的自制酵母甘露寡糖添加量分别使乳酸杆菌增加了 9.37%、10.77%、10.52%, 大肠杆菌减少了 7.12%、14.80%、16.36%。乳酸杆菌与大肠杆菌的比值也明显高于对照组。随着自制酵母甘露寡糖添加量的增加大肠杆菌的数量出现明显的减少趋势, 而乳酸菌的变化不明显。

2.2 实验 II 结果

对实验 II 鱼池中的鱼取鱼肠道, 测定鱼肠道中乳酸杆菌和大肠杆菌的数量如表 3 所示。

由表 3 可知, 饲料中添加 0.5% 的自制酵母甘露寡糖和 0.5% 的外购甘露寡糖分别使罗非鱼幼鱼肠道中的乳酸杆菌增加了 10.77%、11.08%, 大肠杆菌的数量减少了 14.80%、7.67%; 由乳酸杆菌与大肠杆菌的比值来看, 饲料中添加 0.5% 的自制酵母甘露寡糖明显增加了乳酸杆菌的比例。黄霉素的加入明显抑制了肠道中乳酸杆菌的增殖, 使乳酸杆菌较对照组减少 20.39%。

2.3 鱼肠道微生物总基因组 DNA 的提取

分别提取实验 I、II、罗非鱼幼鱼 6 个样品的肠道微生物基因组总 DNA, 如图 1 所示, 从电泳图中看出, 得到了清晰的鱼肠道微生物总 DNA 条带, 且条带在 23 kb 左右。

表 2 自制酵母甘露寡糖对罗非鱼幼鱼生长中肠道微生物的影响
Table 2 Effects of self-made yeast mannan-oligosaccharides on intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae

	对照组 Controls	自制酵母甘露寡糖 Self-made yeast mannan- oligosaccharides (0.25%)	自制酵母甘露寡糖 Self-made yeast mannan- oligosaccharides (0.5%)	自制酵母甘露寡糖 Self-made yeast mannan- oligosaccharides (0.75%)
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i> [lg(CFU/g)]	6.34 \pm 0.01 ^a	6.93 \pm 0.01 ^b	7.02 \pm 0.00 ^b	7.01 \pm 0.00 ^b
大肠杆菌 <i>E. coli</i> [lg(CFU/g)]	8.48 \pm 0.00 ^d	7.88 \pm 0.00 ^c	7.23 \pm 0.02 ^b	7.09 \pm 0.02 ^a
乳酸杆菌数/大肠杆菌数 <i>Lactobacillus</i> / <i>E. coli</i>	0.7473	0.8804	0.9720	0.9879

注: 同一行数据后的不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Values in rows with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 3 自制酵母甘露寡糖、外购甘露寡糖和黄霉素对罗非鱼幼鱼生长中肠道微生物的影响
Table 3 Effects of self-made yeast mannan-oligosaccharides, purchased mannan-oligosaccharides and flavomycin on intestinal microorganism of *Tilapia* larvae

	对照组 Controls	自制酵母甘露寡糖 Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.5%)	外购甘露寡糖 Purchased mannan-oligosaccharides (0.5%)	黄霉素 Flavomycin (8 µg/g)
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i> [lg(CFU/g)]	6.34 ± 0.01 ^b	7.02 ± 0.00 ^c	7.04 ± 0.01 ^c	5.05 ± 0.02 ^a
大肠杆菌 <i>E. coli</i> [lg(CFU/g)]	8.48 ± 0.00 ^d	7.23 ± 0.02 ^c	7.83 ± 0.01 ^b	6.40 ± 0.00 ^a
乳酸杆菌数/大肠杆菌数 <i>Lactobacillus</i> / <i>E. coli</i>	0.7473	0.9720	0.8995	0.7887

注: 同一行数据后的不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。
Note: Values in rows with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

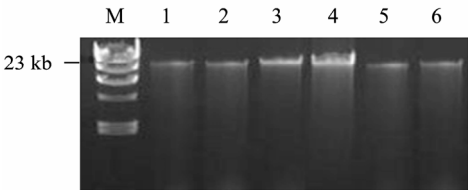


图 1 罗非鱼幼鱼肠道微生物总 DNA 电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae

注: M: Marker; 1: 对照组; 2: 自制酵母甘露寡糖样(0.25%); 3: 自制酵母甘露寡糖样(0.5%); 4: 自制酵母甘露寡糖样(0.75%); 5: 外购甘露寡糖样(0.5%); 6: 黄霉素.

Note: M: Marker; 1: Control; 2: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.25%); 3: Purchased mannan-oligosaccharides (0.5%); 4: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.75%); 5: Purchased mannan-oligosaccharides (0.75%); 6: Flavomycin.

2.4 鱼肠道微生物 16S rDNA 的 V₃ 可变区 PCR 扩增结果

以上述提取的微生物总基因组 DNA 为模版, 做 16S rDNA 的 V₃ 可变区 PCR 扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 均获得 200 bp 左右的特异性扩增片段, 从图 2 中看, 样品都有较亮的扩增条带, 本实验的 PCR 扩增条件是比较合适的, 适合用于接下来的 DGGE 电泳分析。

2.5 不同饲养条件下 16S rDNA-DGGE 指纹图谱建立、聚类分析及相似系数分析

实验 I、II 中罗非鱼幼鱼肠道微生物 16S rDNA V₃ 区片段的 DGGE 指纹图谱及聚类分析结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 在罗非鱼幼鱼饲料中添加不同梯度的自制甘露寡糖、外购甘露寡糖和黄霉素都会明显改变罗非鱼幼鱼肠道微生物的微生态环境, 说明鱼肠道微生物易受饲料的影响, 聚类分析结果表明

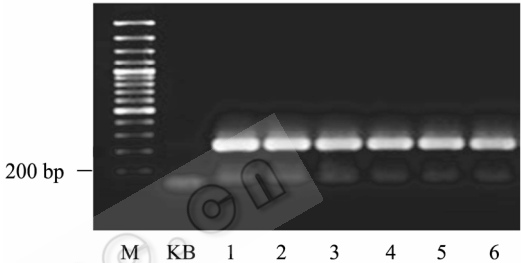


图 2 罗非鱼幼鱼肠道微生物 16S rDNA V₃ 区片段 PCR 扩增图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of V₃ region of 16S rDNA amplified with total DNA from intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae

注: M: Marker; KB: 阴性对照; 1: 对照组; 2: 自制酵母甘露寡糖样(0.25%); 3: 自制酵母甘露寡糖样(0.5%); 4: 自制酵母甘露寡糖样(0.75%); 5: 外购甘露寡糖样(0.5%); 6: 黄霉素.

Note: M: Marker; KB: Negative control; 1: Control; 2: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.25%); 3: Purchased mannan-oligosaccharides (0.5%); 4: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.75%); 5: Purchased mannan-oligosaccharides (0.75%); 6: Flavomycin.

6 个样品在 0.8 的相似度上可分为 3 类, 对照组与抗生素为一类, 外购甘露寡糖单独一类, 3 个梯度添加量的自制甘露寡糖为一类。

由表 4 可知, 3 个不同添加自制酵母甘露寡糖样与对照组相似系数小于 0.75, 属于中等相似水平, 说明自制甘露寡糖的添加改变了罗非鱼幼鱼原有的肠道微生物的微生态环境; 3 个添加自制酵母甘露寡糖样间的相似系数大于 0.75, 属于极相似, 说明添加不同水平的自制甘露寡糖对罗非鱼幼鱼肠道微生物的微生态环境影响效果相近; 外购甘露寡糖和黄霉素与对照组的相似系数大于 0.75, 属于极相似, 说明外购甘露寡糖没有明显改变罗非鱼幼鱼肠道微生物菌群的种类; 0.5% 添加量的外购甘露寡糖与

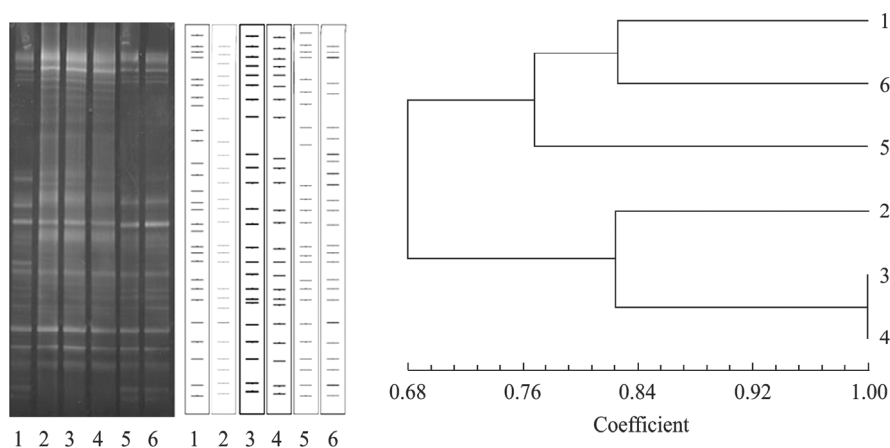


图3 罗非鱼幼鱼肠道微生物 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱(左)及聚类分析(右)

Fig. 3 The PCR-DGGE fingerprints (Left) and the dendrogram (Right) of the PCR-DGGE fingerprints of 16S rDNA of intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae

注: 1: 对照组; 2: 自制酵母甘露寡糖样(0.25%); 3: 自制酵母甘露寡糖样(0.5%); 4: 自制酵母甘露寡糖样(0.75%); 5: 外购甘露寡糖样(0.5%); 6: 黄霉素。

Note: 1: Control; 2: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.25%); 3: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.5%); 4: Purchased mannan-oligosaccharides (0.75%); 5: Purchased mannan-oligosaccharides (0.5%); 6: Flavomycin.

表4 不同饲养条件下的罗非鱼幼鱼肠道微生物相似系数
Table 4 Similarity coefficients of intestinal microorganisms of *Tilapia* larvae under different feeding conditions

Samples	1	2	3	4	5	6
1	1.00					
2	0.69	1.00				
3	0.63	0.79	1.00			
4	0.63	0.79	1.00	1.00		
5	0.77	0.82	0.63	0.63	1.00	
6	0.80	0.63	0.61	0.61	0.70	1.00

注: 1: 对照组; 2: 自制酵母甘露寡糖样(0.25%); 3: 自制酵母甘露寡糖样(0.5%); 4: 自制酵母甘露寡糖样(0.75%); 5: 外购甘露寡糖样(0.5%); 6: 黄霉素。

Note: 1: Control; 2: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.25%); 3: Self-made yeast mannan-oligosaccharides (0.5%); 4: Purchased mannan-oligosaccharides (0.75%); 5: Purchased mannan-oligosaccharides (0.5%); 6: Flavomycin.

0.25%添加量的自制甘露寡糖的相似系数为 0.82, 属于极相似, 说明 0.25%添加量的自制甘露寡糖就能达到 0.5%外购甘露寡糖添加量对罗非鱼幼鱼肠道微生物微生态影响的效果。

由此可知, 自制酵母甘露寡糖、外购甘露寡糖、黄霉素的加入都改变了罗非鱼幼鱼原有的肠道微生物的微生态环境, 即鱼肠道微生物的微生态环境易受饲养条件的影响, 这与 Sakata T、Trust T J 和 Sugita H^[15-18]等研究结果一致。在本实验中自制酵

母甘露寡糖对罗非鱼幼鱼肠道微生物的微生态影响最大。

3 讨论

甘露寡糖已经广泛应用于食品工业、医药领域、畜产养殖和水产养殖等行业, 其中主要是做为饲料添加剂应用于养殖业。随着对甘露寡糖的研究发现, 甘露寡糖能提高动物肠道中双歧杆菌和乳酸杆菌的数量^[19-20], 阻止病原菌(大肠杆菌)的定殖^[21]; 甘露寡糖还能吸附霉菌毒素(玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素)^[22], 起到排除毒素的作用; 甘露寡糖还具有明显的增加免疫器官的重量的作用^[23]。在本文中只讨论了甘露寡糖对奥尼罗非鱼肠道微生物的影响。另外甘露寡糖还能提高奥尼罗非鱼的生长性能、营养物质消化率和血清非特异性免疫^[24]。甘露寡糖作为一种安全、无毒副作用的新型绿色环保饲料添加剂有可能替代抗生素。

参考文献

- [1] 岳文斌, 车向荣, 藏建军, 等. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道主要细菌群的免疫机能的影响. 山西农业大学学报, 2002, 22(2): 98-101.
- [2] 周红丽, 张石蕊. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道菌群和抗体水平及生长性能的研究. 湖南农业大学, 2002, 28(2): 135-143.

- [3] 周映红, 张石蕊. 甘露寡糖对鸡肉生产性能和肠道微生物以及免疫机能的影响. 湖南农业大学学报, 2003, **29**(3): 250–253.
- [4] 王定发, 王春芳, 刘晓华, 等. 甘露寡糖饲喂犊牛的重复试验. 粮食与饲料工业, 2004(9): 34–35.
- [5] Heinrichs AJ, Jones CM, Heinrichs BS. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J Dairy Sci*, 2003(86): 4064–4069.
- [6] 赵晓静, 李建国, 李秋风, 等. 甘露寡糖对犊牛粪便菌群影响的研究. 反刍动物营养, 2007, **43**(5): 31–34.
- [7] Staykov Y, Spring P, Denev S, *et al.* Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 2007, **15**(2): 153–161.
- [8] Staykov Y, Denev S, Spring P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L) // Howell B, Flos R (eds). Lessons from the past to optimise the future. *European Aquaculture Society*, 2005(35): 431–432.
- [9] 杨先芹, 孙丹, 杨文博, 等. 地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株的产酶条件和粗酶性质的研究. 南开大学学报, 2002, **35**(2): 117–120.
- [10] 马相杰, 汪立平, 冷向军, 等. β -甘露聚糖酶水解酵母细胞壁水解条件的研究. 食品科技, 2009, **34**(2): 7–10.
- [11] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998(73): 127–141.
- [12] 汪立平, 马相杰, 赵勇. 罗非鱼幼鱼肠道微生物基因组 DNA 的提取. 湖南农业科学, 2009(10): 147–150.
- [13] Zhang T, Fang HP. Digitization of DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnology Letters*, 2000 (22): 399–405.
- [14] 张秀娟, 杨晨利, 倪向利, 等. 洞庭湖湿地小型节肢土壤动物菌落组成及特征. 湖南理工学院报: 自然科学版, 2005, **18**(3): 62–65.
- [15] Trust TJ, Bull LM. Obligate anaerobes bacteria in the gastrointestinal microorganisms of the grass carp, goldfish, and rainbow trout. *J Fish Res Board Can*, 1979(36): 1174–1179.
- [16] Sakata T, Sugita H, Mitsuoka T, *et al.* Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of freshwater fish. *Bull Jpn Soc Sic Fish*, 1980(46): 1249–1255.
- [17] Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. The intestinal microorganisms of carp *Cyprinus carpio*, grass carp and tilapia. *Bull Jpn Soc Sic Fish*, 1985(51): 1325–1329.
- [18] MacFarlane RD, McLaughlin JJ, Bullock GL. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal environments. *J Wildl Dis*, 1986(22): 344–348.
- [19] Fernandez F, Hinton M, Van Gils B. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology*, 2002, **31**(1): 49–58.
- [20] 杜英男, 鞠贵春, 薛军, 等. 果聚糖和甘露寡糖对水貂肠道菌群影响的研究. 经济动物学报, 2007, **11**(2): 83–86.
- [21] 石宝明, 单安山. 寡聚糖在饲料中的研究与应用. 饲料研究, 2000(4): 13–18.
- [22] Zaghini A, Martelli G, Roncada P, *et al.* Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poultry Science*, 2005, **84**(6): 825–832.
- [23] 李广, 付明哲, 刘璐, 等. α -甘露低聚糖对雏鸡免疫器官发育的影响. 甘肃农业大学学报, 2001, **36**(4): 383–387.
- [24] 刘爱君, 冷向军, 李小勤, 等. 黄霉素和甘露寡糖对奥尼罗非鱼的生长性能及血清非特异性免疫的影响. 中国饲料, 2009(3): 29–32.