

## 投喂低聚木糖对草鱼肠道菌群的影响

熊娟 吴志新 张朋 曲艺 付思思 刘佳佳 陈孝煊\*

(华中农业大学水产学院 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 投喂添加 0.1%、0.2%、0.4%和 0.6%低聚木糖的基础饲料 56 d, 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠道菌群进行了研究。分别在投喂前(0 d)和投喂后的第 14、28、42 和 56 天取样, 对草鱼肠道大肠杆菌(*E. coli*)、气单胞菌(*Aeromonas*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)数量进行了分析。结果表明: 基础饲料中添加不同浓度的低聚木糖对草鱼肠道菌群有一定影响, 大肠杆菌数量在 28 d 达最低值, 其中 0.4%组减少的幅度最大, 与对照组比较显著减少( $P<0.05$ ); 气单胞菌数量均有减少但与对照组比较差异并不显著; 双歧杆菌数量均有增加, 其中 0.4%组在第 14 天时差异显著( $P<0.05$ )。因此, 饲料中添加 0.4%低聚木糖效果最佳, 有利于草鱼肠道菌群保持健康的状态。

**关键词:** 低聚木糖, 草鱼, 肠道, 菌群

## Effects of dietary xylo-oligosaccharide on intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

XIONG Juan WU Zhi-Xin ZHANG Peng QU Yi FU Si-Si LIU Jia-Jia  
CHEN Xiao-Xuan\*

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) feeding with xylo-oligosaccharide for 56 days by concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.4% and 0.6% respectively was investigated in this paper. Numbers of *E. coli*, *Aeromonas* and *Bifidobacterium* were analyzed before feeding and after 14, 28, 42, 56 days. The results showed that there was a certain influence on the intestinal microflora of grass carp after fed with different concentrations of xylo-oligosaccharides. The quantity of *E. coli* in the intestine of grass carps was smallest on the 28th day, and compared with the control group, 0.4% group significantly different ( $P<0.05$ ) has the highest decreasing magnitudes. The quantity of *Aeromonas* reduced but there was no significant difference with control. The quantity of *Bifidobacterium* increased and there was significant difference ( $P<0.05$ ) between control and 0.4% group on 14th day. Therefore, feedstuffs with xylo-oligosaccharide, which were conducive to maintain a healthy state of intestinal

microflora, group with 0.4% has the best effect.

**Keywords:** Xylo-oligosaccharide, Grass carp, Intestine, Microflora

低聚木糖(Xylo-oligosaccharide, XO)和其他低聚糖如低聚果糖、乳果糖、异麦芽糖等一样,是近发展起来的一种功能性低聚糖<sup>[1-2]</sup>。国内外众多研究表明,低聚木糖促进动物生长的作用主要是通过选择性促进乳酸杆菌、双歧杆菌和链球菌等肠道有益菌群在消化道中的定殖,而间接发挥对动物的营养及促生长效应<sup>[3]</sup>。因此,低聚木糖成为动物营养学研究的新热点,由全国饲料工业标准化技术委员会提出的“饲料添加剂低聚木糖”国家标准(GB/T 23747-2009),已于2009年9月1日起正式实施。目前对于低聚木糖的研究基本停留在畜禽方面,而对水产动物的研究少见报道。本试验以草鱼为受试鱼,检测了投喂低聚木糖饲料后草鱼生长性能和肠道细菌数量的变化,旨在为低聚木糖在水产养殖中的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)购自武汉市水产良种站。选择体质健壮,无病无伤,规格基本一致,体重在50 g左右的草鱼。低聚木糖是由2-7个木糖分子以 $\beta(1-4)$ 糖苷键结合而成的功能性聚合糖,本实验所用商品低聚木糖浓度为95%,由山东龙力生物有限公司提供。

### 1.2 饲料配方(W/W)

以鱼粉(12%)、豆粕(25%)、菜粕(30%)、面粉(27%)、豆油(2.2%)、磷酸二氢钙(2%)、羧甲基纤维素(1%)、多维(0.1%)、多矿(0.3%)、食盐(0.2%)、氯化胆碱(0.2%)组成基础日粮,其粗蛋白、粗脂肪、水分、灰分的含量分别为33.28%、6.89%、10.59%、7.52%。

### 1.3 试剂及培养基

伊红美蓝琼脂培养基(EMB)、气单胞菌培养基(RYAN)、双歧杆菌培养基(BS)及相关生化鉴定试剂购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.4 饲养管理

取健康,规格,重量基本一致的草鱼随机分为5组,A0组为对照组,A1组、A2组、A4组和A6组为试验组,每组设3个平行。对照组投喂基础饲料,A1组、A2组、A4组和A6组分别在基础饲料的基础上添加0.1%、0.2%、0.4%、0.6%的低聚木糖,试验鱼用1%的食盐水消毒,饲养于华中农业大学水产养殖基地,采用流水养殖,全天24 h充氧,驯养14 d后开始正式试验。每天上午9点和下午4点分别按体重的3%-5%投喂相应饲料,整个试验期间水温为22℃-28℃,pH值为6.4-7.0,总硬度7.13-9.15。每隔14 d称量各箱鱼体重,以调整饲料投喂量。

### 1.5 测定方法

于试验开始前(第0天)和试验开始后的第14、28、42和56天取样,每次取样前停食1 d。每个试验平行组采样3尾草鱼(每个处理共9尾鱼)。

**1.5.1 好氧及兼性厌氧菌的计数与鉴定:**取样时,先用75%酒精棉球消毒鱼体表,打开腹腔,消毒肠管外壁,剔除周围脂肪组织,并用无菌水冲洗数遍后用无菌棉线分别结扎食道、肛门,用玻璃匀浆器将肠道匀浆,准确称取0.5 g,加无菌水4.5 mL,充分混匀,制成肠道细菌原液设为 $10^{-1}$ ,再用灭菌生理盐水对 $10^{-1}$ 样品进行倍比稀释至 $10^{-6}$ ,各稀释度样品均置于摇床振荡器上振荡均匀。取 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 和 $10^{-5}$ 3个稀释度各100  $\mu$ L分别涂布在EMB、RYAN选择性培养基上,每个稀释度涂3个培养皿,以便计算其平均值。于28℃下培养24-48 h后,选取深红色、表面光滑凸起、具有金属光泽、边缘整齐不透明、质地软粘、直径为1.0 mm-1.3 mm的大肠杆菌菌落和绿色、半透明、表面光滑的气单胞菌进行计数,换算成每克肠道及内容物所含细菌数 $[\lg(\text{CFU/g})]$ ,在各组肠道细菌的分离平板中选取菌落清晰、分散良好而且菌落数在30-300个的平板,随机挑选30-50个菌落接种在FWA斜面培养基,28℃下培养24-48 h后做进一步理化鉴定。

**1.5.2 厌氧菌的计数与鉴定:** 样品采集和处理的方法与 1.5.1 基本相同, 不同在于所采样品用灭菌的还原性稀释液进行洗涤、研磨和稀释, 稀释好的样品立即置于厌氧培养箱中, 取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  3 个稀释度各 100  $\mu\text{L}$  涂布在 BS 选择性培养基上, 每个稀释度涂 3 个培养皿, 以便计算其平均值。待稀释液完全吸收后倒置, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{NO}$  环境下, 用 SHELLAB 厌氧培养箱培养(型号 Bactron-1.5) 48–72 h 后, 按可数性原则选择适当的培养皿进行计数, 并换算成每克肠道及内容物所含细菌数 $[\lg(\text{CFU/g})]$ 。

**双歧杆菌鉴定:** 菌落圆形, 隆起, 表面光滑, 湿润, 边缘整齐, 半透明, 直径 1.0 mm–1.5 mm。革兰氏染色为阳性, 好氧条件下  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 48 h, 不能生长, 并做进一步理化鉴定。

## 1.6 数据处理

试验数据用 STATISTICA 6.0 软件进行统计分析, 组间差异采用 Duncan's 多重比较, 显著水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 投喂低聚木糖对草鱼肠道大肠杆菌属和气单胞菌属的影响

在投喂低聚木糖前, 草鱼全肠的大肠杆菌数量为  $1.10\times 10^6$ – $1.33\times 10^6$  CFU/g, 投喂低聚木糖后, 草鱼肠道中大肠杆菌的数量, 呈现减少的趋势, 所有

组在第 28 天达最低值, 其中 A4 组减少的幅度最大, 并在 28 d 时与对照组比较显著减少( $P<0.05$ )。其次是 A2 组, 而 A1 组保持在  $1.00\times 10^6$ – $1.30\times 10^6$  CFU/g, 与对照组保持在  $1.14\times 10^6$ – $1.27\times 10^6$  CFU/g 差异并不明显。随着投喂时间的增加, 各肠段大肠杆菌的数量又呈现增加的趋势, 但均低于对照组, 见图 1。

在投喂低聚木糖前, 草鱼全肠的气单胞菌数量为  $3.41\times 10^6$ – $4.05\times 10^6$  CFU/g, 投喂低聚木糖后, 草鱼肠道中气单胞菌的数量, 出现减少的趋势, 所有组在第 28 天达最低值, 其中 A4 组减少的幅度最大, 其次是 A2 组, 而 A6 组保持在  $3.11\times 10^6$ – $3.64\times 10^6$  CFU/g, 与对照组保持在  $3.00\times 10^6$ – $4.11\times 10^6$  CFU/g, 差别并不明显。整个实验组与对照组比较差异并不显著( $P>0.05$ )。随着投喂时间的增加, 各肠段气单胞菌的数量又呈现增加的趋势, 但均低于对照组, 见图 2。

### 2.2 投喂低聚木糖对草鱼肠道专性厌氧菌的影响

在投喂低聚木糖前, 草鱼全肠的双歧杆菌数量为  $1.84\times 10^7$ – $2.06\times 10^7$  CFU/g, 投喂低聚木糖后, 草鱼肠道中双歧杆菌的数量呈现增多的趋势, 所有组在第 28 天达最高值, 其中 A4 组增加的幅度最大, 并且在第 14 天时与对照组比较显著增加( $P<0.05$ ), 其次是 A1 组。随着投喂时间的增加, 各肠段双歧杆菌的数量又呈现减少的趋势, 但均高于对照组, 见图 3。

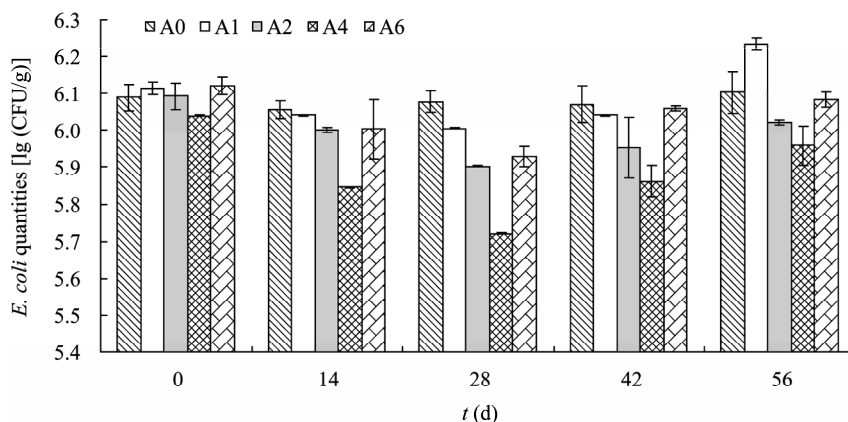


图 1 投喂低聚木糖前后草鱼肠道大肠杆菌数量的变化

Fig. 1 Variation of *E. coli* quantities in the intestinal tract of *C. idellus* before and after treated with xylo-oligosaccharide

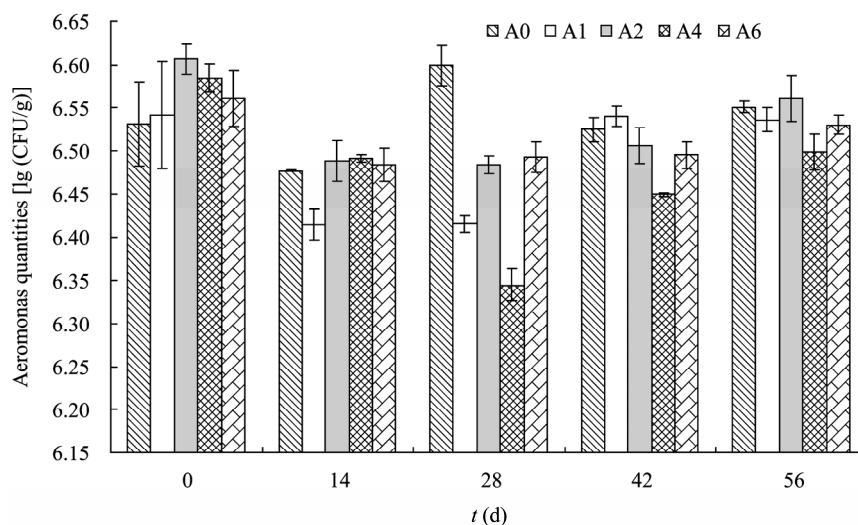


图 2 投喂低聚木糖前后草鱼肠道气单胞菌数量的变化

Fig. 2 Variation of *Aeromonas* quantities in the intestinal tract of *C. idellus* before and after treated with xylo-oligosaccharide

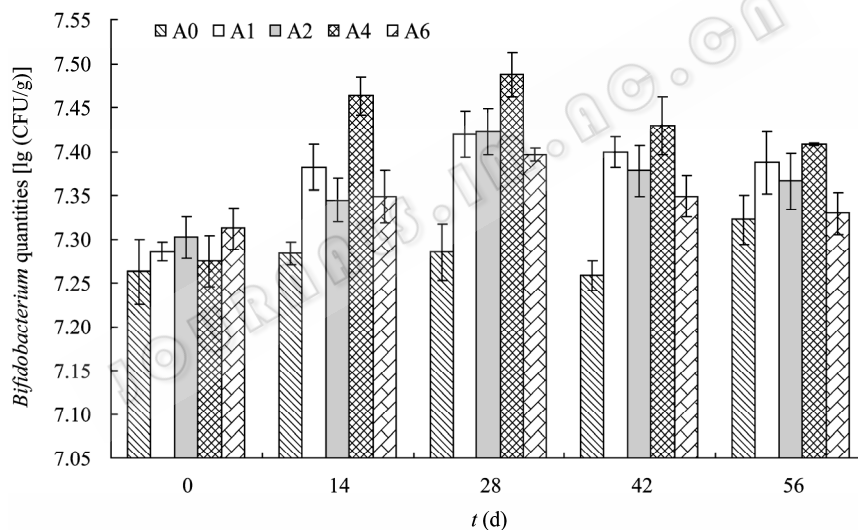


图 3 投喂低聚木糖前后草鱼肠道双歧杆菌数量的变化

Fig. 3 Variation of *Bifidobacterium* quantities in the intestinal tract of *C. idellus* before and after treated with xylo-oligosaccharide

### 3 讨论

低聚糖分子间结合位置及结合类型有其特殊性,不能被动物体内自身分泌的消化酶分解,是一种非消化寡糖,进入肠道后能被双歧杆菌等分泌的糖苷酶水解,进一步生成单糖和挥发性脂肪酸等,使肠道有益微生物得到大量繁殖,成为肠道内优势菌群;但几乎不能被有害菌(如大肠杆菌、沙门氏菌等)利用<sup>[4-5]</sup>。相对于其他低聚糖,低聚木糖能更有

效增加肠道中双歧杆菌的数量<sup>[6]</sup>,它能为双歧杆菌提供碳源,保持肠道水分,产生短链脂肪酸,同时降低肠道 pH 值<sup>[7]</sup>。正常情况下,鱼肠道中有大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等<sup>[8-10]</sup>。低聚木糖能改善草鱼肠道菌群的生态平衡,是因为其可通过对肠道粘膜上皮的竞争性,与病原菌的外源凝集素特异性结合,使病原菌不能在肠壁上粘附而随低聚木糖排出体外,或通过增殖双歧杆菌而产生乙酸、乳酸等

短链脂肪酸和抗菌物质, 从而降低肠道环境中的 pH, 抑制大肠杆菌、沙门氏菌等致病菌的黏附和定植, 增强有益菌的竞争优势, 阻止产生致病因子<sup>[11-12]</sup>。刘波等研究表明在基础粮中添加地衣芽孢杆菌和低聚木糖可提高鱼体中消化酶的活性, 有助于维持肠道内的微生态平衡, 促进动物生长<sup>[13]</sup>。

研究中发现, 投喂不同浓度低聚木糖饲料后, A4 组草鱼增重率与对照组相比显著提高( $P<0.05$ ), A2 和 A4 饵料系数均显著降低( $P<0.05$ ), 表明添加一定量的低聚木糖调整了肠道菌群, 维持了肠道微生态平衡, 可提高草鱼的生长性能(结果将另文发表)。

本文发现, 投喂低聚木糖后, 各组草鱼肠道大肠杆菌数量在实验前期均有减少, 其中 A2 和 A4 组在第 28 天后显著减少( $P<0.05$ ), 但随着时间的增加, 大肠杆菌数量又呈现增加的趋势; 气单胞菌数量均有减少但并不明显; 双歧杆菌数量均有增加, 其中 A4 组在第 14 天时差异显著( $P<0.05$ ), 但在试验后期呈现减少的趋势。本试验的研究结果还表明, 投喂不同剂量的低聚木糖饲料对草鱼肠道细菌数量产生不同的影响, 在适当的剂量下, 才能取得好的效果。当低聚木糖的添加量为 0.6% 时, 其对肠道双歧杆菌数量增加, 大肠杆菌、气单胞菌数量减少的效果不如添加量为 0.4%, 说明低聚木糖对草鱼肠道菌群的调节有一定的适量范围, 这种现象也见于果聚糖和甘露寡糖对水貂肠道菌群的影响<sup>[14]</sup>, 以及果寡糖对肥育猪生长及肠道菌群的影响<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 李佳. 低聚木糖的生产及应用研究综述[J]. 江西食品工业, 2004(3): 32-35.
- [2] 徐冬, 韩玉洁, 徐忠. 低聚木糖的综合开发利用[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 81-83.

- [3] Nakakuki T. Development of functional oligosaccharides in Japan[J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2003(15): 57-64.
- [4] 陈旭东, 马秋刚, 计成, 等. 芽孢杆菌和果寡糖在仔猪营养中的应用[J]. 中国饲料, 2004(3): 24-26.
- [5] Yazawa K, Imai K, Tamura Z. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria[J]. Chem Pharm Bull, 1988, 26(11): 3306-3311.
- [6] Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, et al. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides[J]. Applied Microbiology, 2001, 91(5): 878-887.
- [7] Campbell JM, Fahey GC, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats[J]. Journal of Nutrition, 1997, 127(1): 130-136.
- [8] 王红宁, 何明清, 柳苹, 等. 鲤肠道正常菌群的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(4): 354-359.
- [9] Sakata T, Sugita H, Mitsuoka T, et al. Characteristics of obligate anaerobic bacteria in the intestines of freshwater fish[J]. Bull Japan Soc Sci Fish, 1981, 47(3): 421-427.
- [10] Trust TJ, Sparrow RAH. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater Salmonoid fishes[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1974, 20: 1219-1228.
- [11] 熊沈学, 刘文斌, 方星星. 低聚木糖梯度添加对异育银鲫生长及肠道消化酶活性的影响[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(10): 23-24.
- [12] 蒋正宇, 周岩民, 许毅, 等. 低聚木糖、益生菌及抗生素对肉鸡肠道菌群和生产性能的影响[J]. 家畜生态学报, 2005, 26(2): 11-15.
- [13] 刘波, 谢骏, 刘文斌, 等. 地衣芽孢杆菌与低聚木糖对异育银鲫消化酶活性、肠道菌群及生长的影响[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 336-340.
- [14] 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[J]. 经济动物学报, 2007, 11(2): 83-86.
- [15] 胡彩虹, 王友明. 果寡糖对肥育猪生长及肠道菌群等的影响[J]. 无锡轻工业大学学报: 食品与生物技术, 2001, 20(6): 568-572, 577.