

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17236

饲料中添加壳寡糖和霉菌毒素吸附剂对凡纳滨对虾肠道黏膜形态及菌群结构的影响

黄钦成, 谭北平, 董晓慧, 章双, 杨奇慧, 迟淑艳

广东海洋大学 水产动物营养与饲料实验室, 广东 湛江 524088

摘要: 实验旨在研究在饲料中分别或联合添加壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)和霉菌毒素吸附剂(mycotoxins adsorbent)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道黏膜形态及菌群结构的影响。在基础饲料(对照组)中分别添加 250 mg/kg COS、2500 mg/kg 霉菌毒素吸附剂、250 mg COS+2500 mg/kg 霉菌毒素吸附剂(组号为 C0、C0.25、M2.5、C0.25+M2.5), 制成 4 组等氮等能饲料, 投喂初重(0.23 ± 0.02) g 的凡纳滨对虾 8 周。结果显示: COS 与霉菌毒素吸附剂联合使用有助于改善肠道形态学指标, C0.25+M2.5 组绒毛高显著大于 C0、C0.25 组($P < 0.05$), 绒毛宽显著大于 M2.5 组($P < 0.05$), 肌层厚度显著大于其他各组($P < 0.05$)。高通量测序结果表明各组有效操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTUs)数目无显著性差异($P > 0.05$); C0.25+M2.5 组 Observed species 指数、Shannon 指数、PD 值显著低于 M2.5 组($P < 0.05$), 但显著高于 C0.25 组($P < 0.05$), 与 C0 组无显著性差异($P > 0.05$); 肠道菌群主要为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes), C0.25+M2.5 组变形菌门细菌含量最低且厚壁菌门细菌含量最高, 各组拟杆菌门细菌均升高, C0 组含量最低。在属水平上, 弧菌属(*Vibrio*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、*Spongiimonas*、发光杆菌属(*Photobacterium*) 以及 *Candidatus Bacilloplasma* 占主要优势, C0.25+M2.5 组弧菌属、发光杆菌属细菌含量均有效减少; C0.25+M2.5 组发光杆菌属细菌含量最低, 假交替单胞菌属细菌含量最高。250 mg/kg COS 和 2500 mg/kg 霉菌毒素吸附剂联合添加对菌群丰富度无显著影响, 但优化了肠道形态学指标及肠道菌群结构, 提升了肠道健康, 效果优于单一添加组。

关键词: 壳寡糖; 霉菌毒素吸附剂; 凡纳滨对虾; 肠道黏膜; 菌群结构

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)02-0373-11

虾类养殖品作为世界渔业贸易中最重要的水产品之一, 因其需求量的日益增加和极具竞争力的国际价格而在世界市场中占领先地位, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是重要的商业渔业品种, 也是世界养殖业中重要的养殖品种^[1-2]。随着养殖规模的扩大与养殖环境的恶化, 对虾养殖业病害频发, 给养殖业造成了巨大的经济损失; 加之病害防治中抗生素使用所带来一些副作用, 寻找能够有效替代抗生素的添加剂已逐渐成为研究的热点^[3-4]。

壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)是由 2~10 个氨基葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖, 其通常是由甲壳素脱乙酰化产物壳聚糖经过化学法或酶解法而获得^[5-6], 具有众多生物活性, 如抗氧化、增强免疫力及改善肠道微生态环境等^[7]。铝硅酸盐是指含有 Al_2O_3 和 SiO_2 的物质, 沸石、膨润土等都属于铝硅酸盐类霉菌毒素吸附剂, 沸石及层状铝硅酸盐矿物因具有较大的比表面积和离子吸附与交换能力而备受研究者的重视^[8]。肠道不仅是吸收、消化和营养物质交换的

收稿日期: 2017-06-21; 修订日期: 2017-08-25.

基金项目: 渔港建设和渔业产业发展专项(A201608C06); 湛江市科技计划项目(2016A03022); 广东海洋大学人才培养财政专项(002024008).

作者简介: 黄钦成(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: qinchengh0814@163.com

通信作者: 董晓慧, 教授, 博士生导师, 主要从事水产经济动物营养与饲料研究. E-mail: dongxiaohui2003@163.com

重要场所,也是生物机体与外界环境联系最紧密的器官之一^[9],肠道微生物群落在肠道免疫机制中扮演着重要的角色^[10]。研究表明,COS可以有效减轻动物肠道炎症^[11-12],改善奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)^[13]、幼建鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jian*)^[14]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[15]的肠道健康,优化吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[16]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[18]幼鱼肠道菌群结构,有利于肠道有益菌增殖。霉菌毒素会削弱肠道健康,减少有益菌,不利于营养物质的吸收消化^[19],而硅铝酸盐类霉菌毒素吸附剂可以有效阻止多种毒素侵害动物体内^[20],以膨润土为载体的壳聚糖蒙脱石插层复合物具有良好的吸附活性,有利于肠道的健康^[21]。COS和霉菌毒素吸附剂均具有较好的吸附活性,两者联合添加具有较好的应用前景,

然而两者同时应用的研究文献较少。本文通过研究两者分别或同时添加对凡纳滨对虾肠道形态学指标及肠道菌群结构的影响,以评判二者联合添加对凡纳滨对虾肠道健康的影响,为COS和霉菌毒素吸附剂的进一步开发应用积累数据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料和实验设计

在基础饲料(对照组)中分别添加 250 mg/kg COS、2500 mg/kg 霉菌毒素吸附剂、250 mg/kg COS+2500 mg 霉菌毒素吸附剂(组号为 C0、C0.25、M2.5、C0.25+M2.5),制成 4 组等氮等能的实验饲料。实验所用 COS(聚合度 2~8,寡糖含量≥85%)、霉菌毒素吸附剂(100%双极性硅铝酸盐产品)均由深圳市裕农科技股份有限公司提供。基础饲料配方组成和营养成分见表 1。将原料粉碎后过 80 目

表 1 实验饲料配方和营养水平(风干基础)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of the experimental diets (air-dry basis) %

项目 item	组别 group			
	C0	C0.25	M2.5	C0.25+M2.5
红鱼粉 brown fish meal	22.00	22.00	22.00	22.00
豆粕 soybean meal	15.00	15.00	15.00	15.00
花生粕 peanut meal	10.00	10.00	10.00	10.00
小麦面粉 wheat flour	20.00	20.00	20.00	20.00
玉米蛋白粉 corn gluten meal	10.00	10.00	10.00	10.00
虾壳粉 shrimp shell meal	6.00	6.00	6.00	6.00
鱼油 fish oil	2.00	2.00	2.00	2.00
大豆卵磷脂 soy lecithin	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素预混料 vitamin premix ¹⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素 C vitamin C (35%)	0.10	0.10	0.10	0.10
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 mineral premix ²⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.00	1.00	1.00	1.00
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	9.40	9.15	6.9	6.65
壳寡糖 chitosan oligosaccharide	0	0.25	0	0.25
霉菌毒素吸附剂 mycotoxins adsorbent	0	0	2.5	2.5
合计 total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 nutrient levels				
粗蛋白 crude protein	42.77	43.02	43.70	42.90
粗脂肪 ether extract	7.77	7.30	6.94	7.37
粗灰分 ash	8.94	8.68	8.77	9.19

注: 1) 每千克维生素预混料含: 盐酸硫胺素 25.50 g, 核黄素 25.00 g, 盐酸吡哆醇 50.00 g, 维生素 B₁₂ 0.10 g, 维生素 K 5.00 g, 维生素 E 99.00 g, 维生素 A 醋酸酯 50.00 g, 维生素 D 10.00 g, 烟酸 101.00 g, d-泛酸钙 61.00 g, 生物素 25.00 g, 叶酸 6.25 g, 肌醇 153.06 g, 纤维素 389.09 g。
2) 每千克矿物质预混料含有: FeC₆H₅O₇ 13.71 g, ZnSO₄·7H₂O 28.28 g, MgSO₄·7H₂O 0.12 g, MnSO₄·H₂O 12.43 g, CuSO₄·5H₂O 19.84 g, CoCl₂·7H₂O 4.07 g, KI 0.03 g, KCl 15.32 g, NaSeO₃ 0.02 g, 沸石粉 906.18 g。
Note: 1) contain the following per kg of vitamin premix: thiamine hydrochloride 25.50 g, riboflavin 25.00 g, pyridoxine hydrochloride 50.00 g, VB₁₂ 0.10 g, VK 5.00 g, VE 99.00 g, retinyl acetate 50.00 g, VD 10.00 g, nicotinic acid 101.00 g, d-calcium-pantothenate 61.00 g, biotin 25.00 g, folic acid 6.25 g, inositol 153.06 g, cellulose 389.09 g。
2) contained the following per kg of mineral premix: FeC₆H₅O₇ 13.71 g, ZnSO₄·7H₂O 28.28 g, MgSO₄·7H₂O 0.12 g, MnSO₄·H₂O 12.43 g, CuSO₄·5H₂O 19.84 g, CoCl₂·7H₂O 4.07 g, KI 0.03 g, KCl 15.32 g, NaSeO₃ 0.02 g, zeolite power 906.18 g。

筛,按照配方要求准确称量,微量成分采取逐级扩大法混合均匀,用双螺杆挤条机(F-26 华南理工大学,广州)加工成1 mm和1.5 mm两种规格的饲料,60℃烘箱熟化30 min。所制备饲料通风处风干后,用自封袋密封,放于-20℃冰箱中保存备用。

1.2 实验动物与饲养管理

养殖实验在广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地进行,实验虾苗购于湛江中联虾苗场。实验前虾苗在室外水泥池(4.9 m×4.5 m×1.8 m)暂养。养殖实验开始前禁食24 h后分组。根据实验设计挑选体格健壮、活力强,初重为(0.23±0.02) g的虾苗,随机分为4组。采用室内海水养殖系统,每组3个重复,每重复1个0.3 m³玻璃钢桶,每桶放40尾虾。每天分别在08:00、12:00、16:00和20:00各投喂1次,投喂1 h后观察对虾摄食情况,并根据摄食、天气等情况适当调整投喂量。实验前两周每两天换水1次,后期每天换水1次。实验期间水温25.5~30.0℃,海水盐度为26.5~28.0,实验期间连续充氧,溶氧浓度>6.8 mg/L, pH为7.8~8.2,氨氮含量<0.03 mg/L。实验期为8周。

1.3 样本采集及检测

1.3.1 样本采集与DNA提取 养殖实验结束禁食24 h后取样。每个重复随机取3只健康虾的肠道,置于10%甲醛稀液中保存,以备制作肠道石蜡切片。采用HE染色显示各组对虾肠道黏膜结构,并用全自动生物显微镜(LaicaDM6000,德国)观察肠道黏膜形态,每个切片随机测量20组绒毛高、宽及黏膜厚度,拍照并计算平均值。每个重复随机取3只虾,用75%酒精擦拭并于冰盘上剖取完整肠道,用生理盐水漂洗后迅速装入无菌防冻管,并置于液氮中,后转移-80℃超低温冰箱保存,以备菌群检测。对虾肠道DNA提取参照E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit试剂(OMEGA,美国)说明进行。

1.3.2 高通量测序分析 针对细菌的16S rRNA基因V4区片段设计通用引物。测序区域:515F~806R,引物名称:515F, 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'; 806R, 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。利用PCR仪扩增(ABI GeneAmp[®] 9700型),反应体

系:TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL反应体系,包括5×FastPfu Buffer 4.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 5 μmol/L上下游引物 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, 模版DNA 10 μL, 补ddH₂O至20 μL。反应程序:95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 27个循环; 72℃ 10 min。PCR产物经10 mg/mL琼脂糖凝胶电泳,成像系统检测后在紫外灯下割取目的条带,称重,按照凝胶回收试剂盒说明书纯化目的产物,最后用20 mg/mL琼脂糖凝胶电泳检测纯化。扩增产物经定量,将DNA浓度调节至25 ng/μL,所有样品按照1:1混匀后,采用高通量测序仪Illumina Miseq (Illumina, 美国)对其进行建库测序。

1.3.3 饲料样品的常规分析 饲料样品常规养分分析,粗蛋白质采用凯氏定氮法(Kjeltec[™] 8400, 瑞典),粗脂肪采用索式抽提法(抽提剂为石油醚),粗灰分采用马弗炉550℃灼烧法测定。

1.4 生物学信息统计及数据处理

对所测序列进行分类单元(operational taxonomic unit, OTU)划分聚类,根据OUT总数和OUT相对丰度计算样品Alpha多样性指数。Alpha多样性(alpha diversity)是对某个样品中物种多样性的分析,包含样品中的物种组成的丰富度和均匀度两个因素,通常用Observed species、Chao1、Shannon以及PD值等指数来评估某个样本的物种多样性,指数越高,表明样本的多样性越复杂。Observed species指数是指样本中实际测定得到的OUT数量,Chao1指数是常用的通过预测样品中OUT数量,衡量样品中OTU丰富度的指数;Shannon指数,它的计算考虑到样品中的分类总数和每个分类所占的比例;PD值是基于系统发生树来计算的一种多样性指数,它用各个样品中OUT的代表序列计算出构建系统发生树的距离,将某一样品中的所有代表序列的枝长加和,从而得到的数值。

实验数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,数据分析采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),组间若有显著性差异,再作Duncan氏多重比较检验,显著性水平为0.05。

2 结果与分析

2.1 饲料中添加 COS 和霉菌毒素吸附剂对凡纳滨对虾肠道黏膜形态的影响

如图 1~4 所示,各添加组肠道发育情况相比对照组(图 1)均有所改善,对照组肠绒毛稀少且不明显,肠壁较薄,COS 组(图 2)绒毛较长,霉菌毒素吸附剂组(图 3)绒毛不明显但优于对照组,两者联合添加时(图 4)绒毛致密。



图 1 对照组凡纳滨对虾肠黏膜形态
Fig. 1 Intestinal mucosa morphology of *Litopenaeus vannamei* in group C0

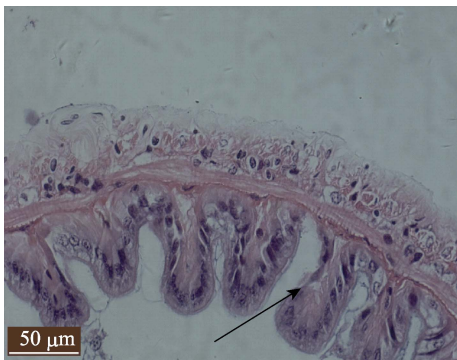


图 2 C0.25 组凡纳滨对虾肠黏膜形态
Fig. 2 Intestinal mucosa morphology of *Litopenaeus vannamei* in group C0.25

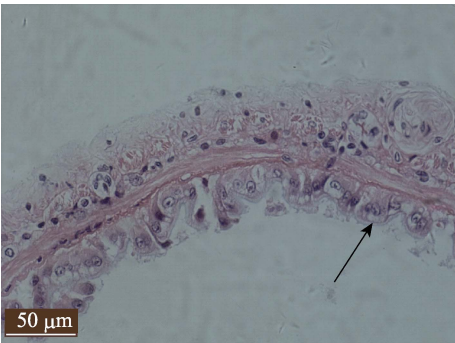


图 3 M2.5 组凡纳滨对虾肠黏膜形态
Fig. 3 Intestinal mucosa morphology of *Litopenaeus vannamei* in group M2.5



图 4 C0.25+M2.5 组凡纳滨对虾肠黏膜形态
Fig. 4 Intestinal mucosa morphology of *Litopenaeus vannamei* in group C0.25+M2.5

测量结果见表 2, C0.25+M2.5 组绒毛高显著高于对照组、C0.25 组($P<0.05$), C0.25+M2.5 组绒毛宽显著高于 M2.5 组($P<0.05$), 与其他各组无显著性差异($P>0.05$)、C0.25+M2.5 组肌层厚度显著高于其他各组($P<0.05$)。

2.2 饲料中添加 COS 和霉菌毒素吸附剂对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响

2.2.1 凡纳滨对虾肠道有效 OTUs 数目统计 各组有效 OTUs 数目各组之间无显著性差异显著($P>0.05$), C0.25 组为最小值。

表 2 凡纳滨对虾肠绒毛长、宽及肠壁厚度
Tab. 2 The height, width of villus and the thickness of intestine wall of *Litopenaeus vannamei*

处理 treatment	C0	C0.25	M2.5	$n=3; \bar{x} \pm SD; \mu m$	
				C0.25+M2.5	
绒毛高 height of intestinal villus	165.87±2.25 ^a	165.97±0.50 ^a	187.46±2.10 ^b	196.66±8.73 ^b	
绒毛宽 width of intestinal villus	134.29±11.62 ^{ab}	161.75±6.12 ^c	122.38±3.80 ^a	150.84±4.95 ^{bc}	
肌层厚度 thickness of muscle layer	179.10±9.76 ^{ab}	167.95±6.32 ^a	197.18±7.05 ^b	248.48±0.69 ^c	

注: 同一行各组上标中有相同字母表示差异不显著($P>0.05$).
Note: The same letters of each treatment in the same line indicates no significant difference ($P>0.05$).

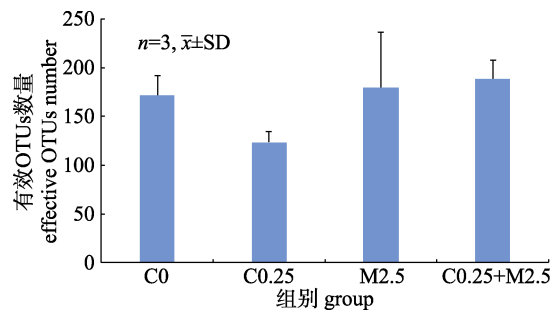


图 5 凡纳滨对虾肠道有效 OTUs 数量
Fig. 5 Effective numbers of OTUs in *Litopenaeus vannamei* intestine

2.2.2 Alpha 多样性分析 结果见表 3。C0.25+M2.5 组 Observed species 指数、Shannon 指数、PD 值显著低于 M2.5 组($P<0.05$), 显著高于 C0.25 组($P<0.05$), 与 C0 组无显著性差异($P>0.05$)。C0.25+M2.5 组物种丰富度指数 Chao1 显著低于 M2.5 组($P<0.05$), 但与其他各组无显著性差异

($P>0.05$)。

2.2.3 肠道菌群结构组成 各实验组在门水平上组成情况见图 6。主要有变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、软壁菌门(Tenericutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、微菌门(Verrucomicrobia)等, 还有部分未鉴定出及含量极少的门(others)类。不同门类在各组比例发生了变化, 每组变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门总含量均达 90%左右, 浮霉菌门在 C0 组含量最高, 其他各组均有下降, 拟杆菌门、厚壁菌门、软壁菌门、软壁菌门在 C0 组含量最低, 其他各组均有所上升, 软壁菌门在 C0.25 组含量最高, 拟杆菌门和厚壁菌门含量在 C2.5 组、M2.5 组及 C0.25+M2.5 组差异不大, 软壁菌门、梭杆菌门、放线菌门、浮霉菌门、微菌门总和不超过 10%。

表 3 凡纳滨对虾肠道 Alpha 多样性
Tab. 3 Alpha diversity in the intestinal tract of *Litopenaeus vannamei*

指数 index	组别 group			
	C0	C0.25	M2.5	C0.25+M2.5
observed species 指数	130.00±5.65 ^b	99.50±13.44 ^a	212.00±5.66 ^c	143.00±5.66 ^b
物种丰富度指数 Chao1	136.02±0.69 ^a	128.95±26.95 ^a	226.64±9.91 ^b	169.14±16.33 ^a
Shannon 指数	3.13±0.23 ^b	2.36±0.24 ^a	4.19±0.27 ^c	3.25±0.18 ^b
PD 值	14.09±0.50 ^b	10.38±1.17 ^a	19.96±0.23 ^c	15.18±0.29 ^b

注: 同一行各组上标中有相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: the same letters of each treatment in the same line indicates no significant difference ($P>0.05$).

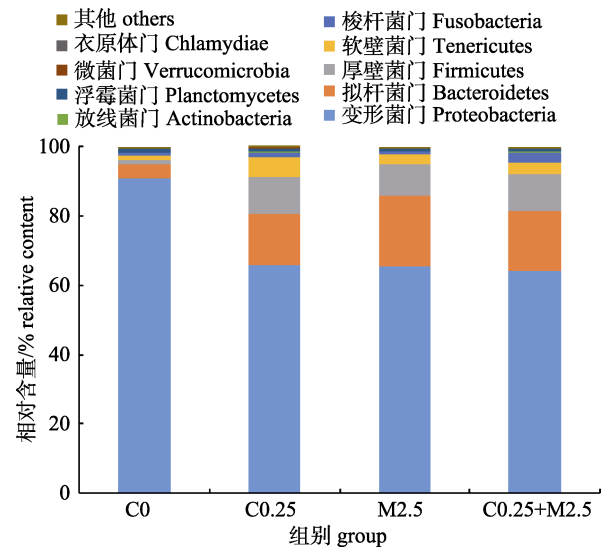


图 6 凡纳滨对虾肠道中门水平细菌种群及含量
Fig. 6 Communities and relative content of bacterial at the level of phylum in *Litopenaeus vannamei* intestine

各组已检测出的种群在属水平上相对比例见图 7。主要有弧菌属 (*Vibrio*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、*Spongiimonas*、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、*Candidatus Bacilloplasma*、*Tenacibaculum*(黄杆菌属)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、浮霉状菌属 (*Planctomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等。各组菌群比例发生了变化, 且弧菌属、假交替单胞菌属、*Spongiimonas*、发光杆菌属、*Candidatus Bacilloplasma* 占主要优势; 弧菌属在各添加组中比例均最大且 C0 组含量最高, 在其他各组下降; 假交替单胞菌属在 C0.25+M2.5 组最高, 其他各组变化不大; *Spongiimonas*在对照组含量最低, 其他各组有所升高; 发光杆菌属在 C0.25+M2.5 组含量达到最低; *Candidatus Bacilloplasma* 在 C0 组

含量最低,其他各组差异不大,其他含量较少;黄杆菌属、盐单胞菌属、不动杆菌属、浮霉状菌属、芽孢杆菌属总和不超过 10%。

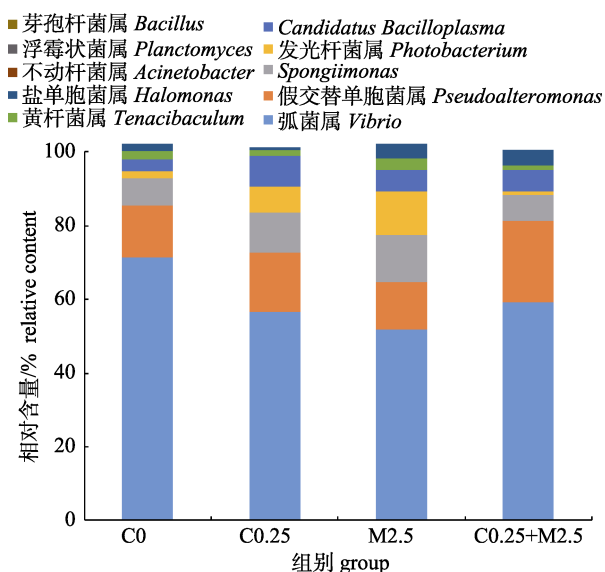


图 7 凡纳滨对虾肠道中属水平细菌种群及含量
Fig. 7 Communities and relative content of bacteria at the level of genus in *Litopenaeus vannamei* intestine

3 讨论

3.1 饲料中添加 COS 和霉菌毒素吸附剂对凡纳滨对虾肠道黏膜形态的影响

小肠的绒毛高度、宽度及黏膜厚度是衡量小肠消化吸收功能的重要指标^[22],绒毛高宽影响肠道消化吸收的表面积,对肠道健康至关重要。肠黏膜肌层厚度反映肠道收缩能力的强弱,其肌层厚度增加让肠道收缩有力,利于食物混匀和消化^[23]。田娟等^[16]研究显示,添加 0.3%或 0.5% COS 时吉富罗非鱼前肠绒毛长、宽及密度均显著增加, COS 可改善大鼠肠黏膜结构,增加不同肠段黏膜上皮内杯状细胞数量,增强小肠吸收功能^[24];壳聚糖可增加草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠黏膜褶皱高度、肌层厚度^[25]。霉菌毒素可破坏肠道上皮细胞,影响动物肠道黏膜的四道屏障,致使肠道微生态失衡,诱导肠道病变^[26],本实验 M2.5 组改善了肠绒毛形态学指标,说明霉菌毒素吸附剂一定程度上减轻了霉菌毒素对肠道的损害。Lamprecht 等^[27]研究表明,沸石有利于人体肠道壁的完整性,并伴随轻度抗炎作用,沸石可以改善脂

多糖胁迫下的肉鸡肠道健康状况,作者认为,沸石可吸收重金属或肠道中的氨等有毒物质,抑制有害菌的增殖,从而减轻肠道的损伤^[28-30]。本实验 C0.25+M2.5 组肌层厚度显著高于其他组,绒毛长、宽分别相对于 C0.25、M2.5 组显著提升,绒毛致密,与以上研究结果一致,说明 COS 与霉菌毒素吸附剂联合添加协同改善了肠道健康状况,效果优于单一添加。

3.2 饲料中添加 COS 和霉菌毒素吸附剂对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响

肠道健康与微生物活动密切相关。肠道消化系统是一个复杂的生态系统,为微生物群体提供庇护所,而肠道微生物在营养、免疫以及防御外界不利因素上扮演着重要的角色^[31]。肠道微生物多样性影响营养物质吸收、机体免疫、新陈代谢,进而影响动物健康^[32]。杂交罗非鱼饲料中添加 COS 可减少肠道病原菌的定植,影响土著菌群数量,优化肠道环境^[13]。饲料中添加 0.05%、0.1%、0.2% 的 COS 均可显著降低红鳍东方鲀肠道菌群 shannon 指数^[15]。饲料中添加不同水平 COS 可降低大菱鲆肠道 Shannon 指数、Chao1 指数及 OTUs 数,降低肠道菌群丰富度^[18],这些与本实验 C0.25 显著降低了 Observed species 指数、Shannon 指数或 PD 值的结果一致。C0.25+M2.5 组 Observed species 指数、物种丰富度指数 Chao1 或 PD 值显著低于 M2.5 组并显著高于 C0.25 组,而与 C0 组无显著性差异,这说明相比任一单独添加组, COS 与霉菌毒素吸附剂联合使用对肠道菌群 Alpha 多样性产生了影响,而相比对照组却无显著性变化,说明肠道整体的微生物种群并未发生大的转变。Prasai 等^[33]认为,肠道微生物区系的稳定以及整体种群未产生重大的变化与动物乃至人类的健康密切相关,肠道的健康状况可能是部分病原体的减少而非整体菌群多样性的变动导致,因此本结果可能正好说明联合添加组并未对肠道的健康状态造成不利影响,而相比单一添加组又起到了一定的调控作用,因此本实验进一步对门水平和属水平肠道菌群做了统计。

从门和属水平结果可知,每组菌群种类组成几乎相似,并未出现新的物种,而各种类相对比

率发生了变化。吴金凤等^[34]报道, 健康凡纳滨对虾肠道指示生物主要门类有变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门等, 野生或驯养的斑节对虾(*Penaeus monodon*)肠道中均发现放线菌门、梭杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门, 且大部分属于变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门^[35]。变形菌门、拟杆菌门、放线菌门在凡纳滨对虾所有生长阶段均显著存在^[36]。这些研究结果与本实验鉴定出的主要种类基本一致。门水平上, 本实验鉴定出变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门等, 各组变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门均处于优势地位, 说明 COS 与霉菌毒素吸附剂单独或联合添加并未影响主体菌的优势地位; 而相对含量发生了变化(相比对照组, 各组变形菌门含量有所下降, 拟杆菌门、厚壁菌门有所升高), 说明其起到一定的调节作用。变形菌门在鱼类样品腐败中起重要作用^[37], 其含量过多(本实验对照组相比其他组较高)通常会引起肠道微生态慢性失调^[38]或肠道炎症^[39], 拟杆菌门与碳水化合物发酵相关并参与糖类、胆汁酸及类固醇代谢^[40], 厚壁菌门在肠道中可帮助多糖发酵^[18], 肠道炎症可能会伴随变形菌门上升及拟杆菌门下降^[40], 本实验 C0.25 组相比 C0 组变形菌门含量下降且厚壁菌门上升, 这与 COS 对大菱鲆肠道菌群结构影响结果一致^[18], C0.25+M2.5 组比对照组变形菌门含量下降且厚壁菌门、拟杆菌门上升, 说明饲料中单独或同时添加 COS、霉菌毒素吸附剂调整了菌群结构, 可能促进了有益菌的增殖且减少了有害菌。属水平上, 弧菌属、假交替单胞菌属、*Spongiimonas*、发光杆菌属、*Candidatus Bacilloplasma* 占主要地位, 弧菌属是对虾中肠道中的正常菌群, 有些有助于碳源的代谢利用, 而有些为致病菌, 大量繁殖不利于对虾健康^[41]。潘金露^[18]、Su 等^[15]研究均证明 COS 会抑制鱼类肠道弧菌属数量, 与本实验结果一致。假交替单胞菌属是新建立的海洋细菌属, 它可以生产多种生物活性物质、抗生素或胞外酶等, 具有抗菌、溶菌、降解纤维素等功能, 其具有巨大的利用潜力和重要的生态学作用^[42-43]。发光杆菌属类似致病杆菌, 可产生多种具有抑菌活性的多肽或蛋白质, 其分泌产物还具有抗菌活

性以及抑制 PO 活性等作用^[44], 可能对动物产生不利影响。*Spongiimonas* 是从一种未命名的海绵动物中分离出的, 属于黄杆菌科中的一员^[45], 其在各组含量较稳定, COS 或霉菌毒素吸附剂并未对其产生大的影响, *Candidatus Bacilloplasma* 曾在七鳃鳗^[46](*Lampetra morii*)及节肢动物门鼠妇^[47](*Porcellio scaber*)(甲壳纲)后肠壁中发现并被定义到软壁菌门柔膜菌纲, 关于 *Spongiimonas*、*Candidatus Bacilloplasma* 对肠道的作用研究较少; 而 *Candidatus Bacilloplasma* 在各组含量均上升, 其可能受到 COS 或霉菌毒素吸附剂的诱导作用。另外, 本实验 C0.25+M2.5 组弧菌属相比 C0 组明显降低, 在各组中发光杆菌属含量最低且假交替单胞菌属含量最高, 说明 COS、霉菌毒素吸附剂联合添加优化了菌群结构, 增加了有益菌比例, 减少了有害菌, 效果优于单一添加组, 与门水平影响一致。黄鑫玮的研究表明 0.6%及 0.9% COS 可显著降低幼建鲤肠道大肠杆菌(*Escherichia Coli*)数量, 显著提高双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)数量^[14]。在饲料中添加沸石明显降低肉鸡血氨浓度及空肠大肠杆菌数量, 并增加乳酸杆菌数量^[29]。肠道优势菌群和养殖种类和养殖环境有关, 也和所用饲料种类和成分相关^[17], 不同的生长阶段也可能表现出不同的优势种^[36]。李玉宏^[48]的研究结果显示, 工厂化养殖的凡纳滨对虾在 8-10 月均以弧菌和杆菌为主要优势菌, 杆菌主要有有发光杆菌、芽孢杆菌等; 张家松等^[41]统计结果显示, 不同鉴定方法得到的凡纳滨对虾肠道菌群组成有, 发光杆菌属、弧菌属以及假单胞菌属等, 这些结果并未提及大量乳酸杆菌或双歧杆菌的存在。因此, 虽然本实验鉴定出的双歧杆菌或乳酸杆菌含量很少(未显示), 但并不能说明两种添加剂对其产生了抑制作用。

壳聚糖的抗菌活性与聚合度、溶解度以及微生物的种类和来源有关^[49]。目前 COS 的可能的抑菌机制解释有: COS 改变了微生物细胞膜渗透压, 阻止了原料的进入或细胞内化学组分的泄漏, 进一步导致细胞死亡^[50]; COS 小分子渗透到细菌体内阻止 RNA 的转运^[51]; COS 通过与微量元素或必需营养素形成螯合物, 限制细菌的生长^[52]。本实

验霉菌毒素吸附剂为一种双极性硅铝酸盐, 其与膨润土或沸石等拥有相似的性质, 沸石因为其多孔结构、较好的层间阳离子可交换能力及催化性能被广泛开发利用^[27-28, 33]。霉菌毒素吸附剂除吸附外毒素还可以吸附细菌及它们产生的内毒素, 其本身不具抑菌杀菌能力, 原因是因为具有抑菌杀菌的阳离子交换到层间^[53]。蒙脱石或沸石具有良好的阳离子交换性质和吸附能力, 适合作为抗菌剂的载体, 因此利用其搭载壳聚糖制备的复合物可以拥有更好的热稳定性、吸附作用或抗菌性能^[54-56]。通过一定制造工艺将 COS 和霉菌毒素吸附剂联合可能研制出性能优异的产品, 因此具有良好的开发空间, 关于二者如何更好地搭配以及其作用效果仍需进一步的研究。

4 结论

250 mg/kg COS 与 2500 mg/kg 霉菌毒素吸附剂联合使用, 对肠道菌群总丰富度无显著影响, 但有助于提升凡纳滨对虾肠道形态学指标, 优化其肠道菌群结构, 改善其健康状况, 效果优于单一添加 COS 或霉菌毒素吸附剂。

参考文献:

- [1] Bhaskar N, Setty T M R, Reddy G V S, et al. Incidence of *Salmonella* in cultured shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1-4): 257-266.
- [2] Keating J, Delaney M, Meehan-meola D, et al. Histological findings, cadmium bioaccumulation, and isolation of expressed sequence tags (Ests) in cadmium-exposed specific pathogen-free shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(4): 1225-1237.
- [3] Chen X, Mai K, Zhang W, et al. Effects of dietary glycyrrhizin on growth and nonspecific immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 665-674.
- [4] Li Z D, Chen X E, Liao Z, et al. Effects of chito-oligosaccharides on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2011, 7(4): 36-42. [李振达, 陈小娥, 廖智, 等. 壳寡糖对凡纳滨对虾生长和免疫力的影响[J]. *南方水产科学*, 2011, 7(4): 36-42.]
- [5] Li X J, Piao X S, Kim S W, et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens[J]. *Poultry Science*, 2007, 86(6): 1107-1114.
- [6] Kim J Y, Kim K N, Kim J G, et al. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Chitosan oligosaccharides*[J]. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 2009, 52(2): 84-87.
- [7] Xu X, Li L M, Zhang M Y. Research progress on biological function of *Chitosan oligosaccharide* and application in livestock nutrition[J]. *Feed Review*, 2015(6): 31-36. [许翔, 李吕木, 张民扬. 壳寡糖的生物学功能及其在畜禽营养中的应用[J]. *饲料博览*, 2015(6): 31-36.]
- [8] Qi D S, Yu Y H. Efficiency and mechanism of aluminosilicate in reducing the toxicity of mycotoxins[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2002(5): 31-33. [齐德生, 于炎湖. 铝硅酸盐类吸附剂对霉菌毒素的选择性吸附机制及其应用[J]. *粮食与饲料工业*, 2002(5): 31-33.]
- [9] Zheng X T, Duan Y F, Dong H B, et al. Progress on gut mucosal immunization of crustacean[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*. 2016(3): 83-90. [郑晓婷, 段亚飞, 董宏标, 等. 甲壳动物肠道免疫系统研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2016(3): 83-90.]
- [10] Macpherson A J, Harris N L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(6): 478-485.
- [11] Yousef M, Pichyangkura R, Soodvilai S, et al. *Chitosan oligosaccharide* as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action[J]. *Pharmacological Research*, 2012, 66(1): 66-79.
- [12] Huang B, Xiao D F, Tan B, et al. *Chitosan oligosaccharide* reduces intestinal inflammation that involves calcium-sensing receptor (CaSR) activation in lipopolysaccharide (LPS)-challenged piglets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(1): 245-252.
- [13] Qin C, Zhang Y, Liu W, et al. Effects of *chito-oligosaccharides* supplementation on growth performance, intestinal cytokine expression, autochthonous gut bacteria and disease resistance in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 267-274.
- [14] Huang X W, Yang S S, Liu Y, et al. Effect of dietary chitosan on growth performance, lipid metabolism, non-specific immune function and intestinal health of juvenile jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2106-2114. [黄鑫玮, 杨莎莎, 刘毅, 等. 壳寡糖对幼建鲤生长性能、脂肪代谢、非特异性免疫功能及肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2106-2114.]
- [15] Su P, Han Y, Jiang C, et al. Effects of chitosan-oligosaccharides on growth performance, digestive enzyme and intestinal bacterial flora of tiger puffer (*Takifugu rubripes*

- Temminck et Schlegel, 1850)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2017, 33(3): 458-467.
- [16] Tian J, Sun L W, Wen H, et al. Effect of dietary *chitooligosaccharides* on growth performance, gut flora and intestinal structure of juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 561-568. [田娟, 孙立威, 文华, 等. 壳寡糖对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、前肠组织结构及肠道主要菌群的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 561-568.]
- [17] Cai X F, Luo L, Zhan W B, et al. Effects of *chitooligosaccharides* on intestinal bacterial flora of Juvenile Rainbow Trout[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(4): 606-610. [蔡雪峰, 罗琳, 战文斌, 等. 壳寡糖对虹鳟幼鱼肠道菌群影响的研究[J]. 中国海洋大学学报自然科学版, 2006, 36(4): 606-610.]
- [18] Pan J L. Effect of *chitosan oligosaccharide* and alginate oligosaccharide on digestive ability and gastrointestinal microbial community of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016. [潘金露. 饲料中壳寡糖和褐藻酸寡糖对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)消化及肠道菌群的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.]
- [19] Broom L. Mycotoxins and the intestine[J]. Animal Nutrition, 2015, 1(4): 262-265.
- [20] Akkaya M R, Bal M A. Efficacy of modified yeast extract and HSCAS containing mycotoxin adsorbent on ruminal binding characteristics of various aflatoxins[J]. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012, 18(6): 951-955.
- [21] Zhao W Y. The antibacterial activity of Cu^{2+} -chitosan/montmorillonite composite and applied effects in broilers[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. [赵文艳. 铜-壳聚糖/蒙脱土复合材料的抗菌性能及其对肉鸡的应用效果[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.]
- [22] Beijing Agricultural University. Agriculture[M]. Press, 1960. [北京农业大学 兽医学系家畜解剖学教研组. 家畜组织学与胚胎学[M]. 北京: 农业出版社, 1960.]
- [23] Zhai S W, Shi Q C, Chen X H. Effect of dietary antimicrobial peptides-surfactin supplementation on parameters of intestinal health indices of genetically improved farmed tilapia (gift, *Oreochromis niloticus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(4): 823-829. [翟少伟, 史庆超, 陈学豪. 饲料中添加抗菌肽 Surfactin 对吉富罗非鱼肠道健康的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 823-829.]
- [24] He Y N. Effects of two types of oligosaccharides on the structures of gut mucosa and mucosal immuno-associated cell in rats[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006. [何亚男. 两种寡糖对大鼠肠黏膜结构及黏膜免疫相关细胞影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.]
- [25] Zhao Y R, Wang H Q, Yu J B. Effects of chitosan on grass carp intestinal morphology[J]. Current Fisheries, 2010, 35(1): 64-66. [赵玉蓉, 王红权, 余建波. 壳聚糖对草鱼肠道形态结构的影响[J]. 当代水产, 2010, 35(1): 64-66.]
- [26] Gao Y N, Wang J Q, Li S L, et al. Effects of mycotoxins on intestinal mucosal barrier function[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(3): 674-679. [高亚男, 王加启, 李松励, 等. 霉菌毒素影响肠道黏膜屏障功能[J]. 动物营养学报, 2016, 28(3): 674-679.]
- [27] Lamprecht M, Bogner S, Steinbauer K, et al. Effects of zeolite supplementation on parameters of intestinal barrier integrity, inflammation, redoxbiology and performance in aerobically trained subjects[J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2015, 12(1): 40.
- [28] Wu Q J, Wang Q Y, Wang T, et al. Effects of clinoptilolite (zeolite) on attenuation of lipopolysaccharide-induced stress, growth and immune response in broiler chickens[J]. Annals of Animal Science, 2015, 15(3): 681-697.
- [29] Zhou Y M, Liu H Y, Jiang Z Y, et al. Effects of zeolite supplement on performance, intestinal microflora and residue of heavy metal in broilers[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(6): 84-88. [周岩民, 刘红艳, 蒋正宇, 等. 不同粒度沸石对肉鸡生产性能、肠道菌群及组织重金属残留的影响[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 84-88.]
- [30] Wu Q J. Effect of clinoptilolite on gut protection of broilers and study of relevant mechanism[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. [吴秋珏. 沸石对肉鸡肠道健康的保护及机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.]
- [31] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5): 313-323.
- [32] Hildebrand F, Nguyen T L A, Brinkman B, et al. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice[J]. Genome Biology, 2013, 14(1): R4.
- [33] Prasai T P, Walsh K B, Bhattacharai S P, et al. Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces campylobacter load[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154061.
- [34] Wu J F, Xiong J B, Wang X, et al. Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(2): 611-621. [吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用[J]. 应用生态学报, 2016,

- 27(2): 611-621.]
- [35] Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, et al. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e91853.
- [36] Huang Z B, Li X Y, Wang L P, et al. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(6): 1737-1746.
- [37] Han S F. Flora structure analysis and isolation, identification and regulation of spoilage organisms during the corruption of Tilapia[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010. [韩少锋. 罗非鱼腐败过程菌群结构分析及腐败菌的分离、鉴定与调控[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.]
- [38] Shin N R, Whon T W, Bae J W. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(9): 496-503.
- [39] Mukhopadhyay I, Hansen R, Elomar E M, et al. IBD-what role do proteobacteria play?[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2012, 9: 219-230.
- [40] Yang J H, Zhao Z H, Guo W B, et al. Effects of deoxynivalenol on intestinal microbiota of mice analyzed by Illumina-MiSeq high-throughput sequencing technology[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(1): 158-167. [杨俊花, 赵志辉, 郭文博, 等. 应用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小鼠肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(1): 158-167.]
- [41] Zhang J S, Duan Y F, Zhang Z Z, et al. Research progress of intestinal microbial flora in shrimp[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 114-119. [张家松, 段亚飞, 张真真, 等. 对虾肠道微生物菌群的研究进展[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 114-119.]
- [42] Yang H J, Tan Z J, Xiao Q M, et al. Biocontrol functions of *Pseudomonas*[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12(3): 158-161. [杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 158-161.]
- [43] Xi Y, Zhu D H, Liu H T, et al. Advances on *Pseudoalteromonas* species and their extracellular bioactive compounds[J]. Microbiology, 2005, 32(3): 108-112. [席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.]
- [44] Xiao Y, Yang X F, Yang H W. Advances in antimicrobial metabolites of the symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(4): 553-558. [肖尧, 杨秀芬, 杨怀文. 致病杆菌和发光杆菌抗菌代谢产物研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 553-558.]
- [45] Yoon J, Jang J H, Kasai H. *Spongiimonas flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from an unidentified marine sponge[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103(3): 625-633.
- [46] Li Y, Xie W, Li Q. Characterisation of the bacterial community structures in the intestine of *Lampetra morii*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2016, 109(7): 979-986.
- [47] Kostanjšek R, Štrus J, Avguštin G. “*Candidatus* Bacilloplasma”, a novel lineage of *Mollicutes* associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(17): 5566-5573.
- [48] Li Y H. The characteristic and function research on the intestinal microflora of shrimp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [李玉宏. 养殖对虾肠道微生物区系的特征与功能[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [49] Tin S, Sakharkar K R, Lim C S, et al. Activity of chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(2): 153-160.
- [50] Sudarshan N R, Hoover D G, Knorr D. Antibacterial action of chitosan[J]. Food Biotechnology, 1992, 6(3): 257-272.
- [51] Kim Y, Lee J K, Lee T S, et al. Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 32(1-2): 23-27.
- [52] Kim S K, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 62(4): 357-368.
- [53] Hu X R, Lu G L, Chen L S, et al. Study on the mechanism of the interaction between montmorillonite and bacterium[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(9): 718-720. [胡秀荣, 吕光烈, 陈林深, 等. 天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究[J]. 药科学报, 2002, 37(9): 718-720.]
- [54] Li Z X, Meng Y, Liang Q, et al. Adsorption of phenol in wastewater with modified zeolite-chitosan adsorbent[J]. Ecology and Environment, 2008, 17(6): 2168-2172. [李增新, 孟韵, 梁强, 等. 壳聚糖改性沸石吸附废水中的苯酚[J]. 生态环境, 2008, 17(6): 2168-2172.]
- [55] Meng Y P, Wei T Y, Pan Y F, et al. Preparation and characterization of chitosan-montmorillonite[J]. Journal of Guangxi University (Natural Science Edition), 2009, 34(4): 505-508, 512. [蒙杨平, 韦藤幼, 潘远凤, 等. 壳聚糖膨润土的制备工艺及表征[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2009, 34(4):

505-508, 512.]

[56] Zhen H B, Hu Y Y, Cheng J H. Adsorption of Cu^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} by chitosan cross-linked zeolite beads[J]. Acta Scientiae

Circumstantiae, 2011, 31(7): 1369-1376. [甄豪波, 胡勇有, 程建华. 壳聚糖交联沸石小球对 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 及 Cd^{2+} 的吸附特性[J]. 环境科学学报, 2011, 31(7): 1369-1376.]

Effect of chitosan oligosaccharide and mycotoxin adsorbents on intestinal mucosa structure and gut flora of *Litopenaeus vannamei*

HUANG Qincheng, TAN Beiping, DONG Xiaohui, ZHANG Shuang, YANG Qihui, CHI Shuyan

Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: A 56-day feed trial was carried out to investigate the effects of chitosan oligosaccharide (COS) and/or mycotoxin adsorbent on the intestinal mucosa structure and gut flora of *Litopenaeus vannamei*. Four isonitrogenous and homoenergetic diets were prepared on the basal diet by adding 0 mg/kg (COS or mycotoxin adsorbent), 250 mg/kg COS, 2500 mg/kg mycotoxin adsorbent, 250 mg/kg COS+2500 mg/kg mycotoxin adsorbent, and named as C0, C0.25, M2.5 and C0.25+M2.5, respectively. The *Litopenaeus vannamei* with an initial weight of 0.23 ± 0.02 g were randomly assigned into 4 groups. The results showed as follows: the combined use of COS and mycotoxin adsorbent helped improve the index of intestinal morphology, group C0.25+M2.5 showed significant difference ($P < 0.05$) about the intestinal villus length with group C0, C0.25, and showed significant difference ($P < 0.05$) about the intestinal width with group M2.5, moreover, the thickness of muscle layer in this group was significantly higher than others ($P < 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.05$) about effective OTUs (Operational taxonomic unit) among groups; index of Observed species and Shannon index and PD (Phylogenetic diversity whole tree) value in group C0.25+M2.5 were significantly lower ($P < 0.05$) than those of group M2.5 and remarkably higher than group C0.25, but showed no significant difference ($P > 0.05$) with group C0. At the phylum level, microbial floras detected in this experiment mainly belonged to Proteobacteria, Firmicutes or Bacteroidetes, group C0.25+M2.5 showed the minimum of Proteobacteria and the maximum of Firmicutes, group C0 showed the minimum of Bacteroidetes. At the level of genus, species mainly detected were *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Spongiimonas*, *Photobacterium* and *Candidatus Bacilloplasma*. *Vibrio* or *Photobacterium* in group C0.25+M2.5 were lower than that of control group. Group C0.25+M2.5 showed the lowest content of *Photobacterium* and the highest content of *Pseudoalteromonas*. It can be concluded that adding COS and mycotoxin adsorbent in diets had no effect of on microbial floras, nevertheless, optimized the index of intestinal morphology and the structure of gut flora, but can promoted intestinal health, and is better than a single adding groups.

Key words: chitosan oligosaccharide; mycotoxin adsorbents; *Litopenaeus vannamei*; intestinal mucosa; gut flora

Corresponding author: DONG Xiaohui. E-mail: dongxiaohui2003@163.com