

鲤肠道正常菌群的研究*

王红宁 何明清 柳 莹 胡廷秀 陈孝跃

(四川农业大学动物科技学院,雅安 625014)

提 要

本实验用稀释滴种的定量方法,对淡水养殖池中健康鲤肠道内的10种菌群进行了定性、定量分析,并对结果进行统计学处理,得到鲤肠菌群的一些生理值。结果表明鲤肠道中需氧、兼性厌氧优势菌是气单胞菌和酵母菌,厌氧优势菌是拟杆菌。对不同时间、不同温度条件下同一养殖池中鲤肠道菌群的测定结果比较表明:葡萄球菌、假单胞菌差异显著($p < 0.05$),气单胞菌、大肠杆菌、需氧芽胞杆菌、酵母菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌、梭状芽孢杆菌差异不显著($p > 0.05$),表明该8种菌群在鲤肠道中的菌数处于相对稳定状态,属于肠道正常菌群。

关键词 鲤,正常微生物群,微生物学

正常微生物群(Normal microbiota)是指在正常条件下对宿主非但无害且有益的微生物群,这些微生物群为宿主创造着生存的微环境,同时宿主也为它们提供着生长繁衍的条件。两者相互依赖、相互制约形成了统一的整体。通过对无菌动物和普通动物的比较研究发现,正常微生物群在提高动物机体免疫力、改善动物生理功能,为动物机体提供合成的维生素等方面起着重要作用^[1]。何明清等对健康猪、鸡和腹泻猪、鸡的肠菌群进行比较研究发现,腹泻猪、鸡的需氧菌数与厌氧菌数是100:1,从而提出了动物腹泻与正常菌群的比例失调有关。徐伯亥等对患肠炎草鱼和正常草鱼肠道中的气单胞菌(*Aeromonas*)进行了比较研究发现,草鱼患肠炎时该菌的数量是健康时的 10^2 — 10^3 倍,从而推断草鱼肠炎的发病机理与气单胞菌的大量繁殖,引起肠机能的紊乱有关^[2]。正常菌群的重要作用以及它的平衡和失调与某些疾病的关系,引起了人们的关注和研究^[3]。

对鱼类肠道菌群的组成,国外曾有一些报道,但没有系统的研究。Smith(1929)对鱼类肠道中的大肠杆菌进行了研究,发现鱼肠道中分离出的大肠杆菌与普通大肠杆菌不同,有液化明胶和不产生吲哚的特性。Vanllden报告在鱼消化道中发现大量酵母菌。Haruo等对淡水养殖池中罗非鱼、金鱼、鲤等肠道菌的研究指出,弧菌-气单胞菌是淡水鱼胃肠道中主要的兼性厌氧菌,主要的专性厌氧菌是A型和B型拟杆菌^[4]。Haruo Sugita报道淡水养殖池中鱼肠道中主要存在的弧菌-气单胞菌群是相当稳定的,而另外的细菌受外界环境因素和饵料组成,水温、pH值,含氨量等影响较大,而且鱼体之间个体差异也很

* 1993年10月9日修回。

大^[5]。Haruo还报道了罗非鱼肠道内菌群在孵出后20—60d便已建立。推断这些细菌来自水、水底沉积物或集约化养殖场中其它鱼类的粪便^[6]。我国学者对鱼类肠道菌群的研究较少,主要针对一些条件致病菌进行了研究。

鉴于国内外对鱼肠道正常菌群的研究现状,本实验选择同一淡水养殖池中,同批放养的鲤,在不同时间选择健康鱼,对其肠道中的10种菌群进行系统的定性定量分析,以得出鲤肠菌群的一些生理值,为研究鱼肠菌群在生态平衡与生态失调时的演替规律,找出某些鱼肠道疾病的发生与菌群变化的关系,以及为如何采用合理的生态疗法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 测定时的条件 实验鱼和水从雅安市某鱼场淡水养殖池中采取。共进行三次测定:
①1989年9月24日,水温21.5℃,pH8.0,含氧量4.05mg/L。②10月26日,水温19.5℃,pH8.43,含氧量3.90mg/L。③11月10日,水温14.0℃,pH7.6,含氧量4.0mg/L。鱼体选择:0.5—1kg,群游,精神食欲正常,剖检时体表、体内无任何充血、出血变化,肠道充盈度较好。

1.2 样本的采取、稀释和滴种 鱼体采集后放入充氧袋中立即送往实验室,用75%酒精擦拭鱼体表进行消毒,从肛门处剪开,然后向上朝前剪成弧形,掀开游离腹壁展现肠道,无菌采取后肠内容物0.5g左右放入预先称重并装有玻珠的无菌三角瓶内,再准确称出肠内容物重量,按1:10加入稀释液,充分振摇10min(250次/min),此为10⁻¹,逐步稀释至10⁻¹⁰。从养鱼池中同时采取水样,并做10⁻¹至10⁻³稀释。稀释液:KH₂PO₄4.5g,Na₂HPO₄6g,L-半胱氨酸0.5g,Tween-80:0.5g,琼脂1g,蒸馏水1000ml,10磅15min灭菌。滴种:用无菌的巴氏吸管下接16号针头(37±0.5滴/ml)从高稀释度开始,向各选择培养基滴下,距离约5cm。每个平板滴三个稀释度,每个稀释度重复三滴,培养对象不同,稀释度的选择不同。其中需氧芽胞杆菌和梭状芽孢杆菌将菌液作80℃20min处理后再行滴种。

1.3 培养基,培养对象及培养条件 培养基制作方法见正常菌群检查法(大连医学院编)。血液系无菌术采集的兔心血。抗菌素:新霉素(Neomycin)和巴龙霉素(Paromycin)系卫生部生物制品检定所生产的国家标准品。0/129(150ug)纸片系哈尔滨市卫生防疫站生产(中国科学院微生物所监制)。将制作好的固体选择培养基放入37℃温箱中烘2—3h,使其表面干燥,然后再行滴种,待滴种的菌液被培养基吸干后再将平皿倒转培养,以防止凝集水滴下,破坏单个菌落的形成。需氧菌和兼性厌氧菌放入37℃恒温箱中培养;厌氧菌放入Gas Pak厌氧罐(中国产)中培养。

1.4 细菌的计数 培养后选菌落生长稀密适当的稀释度计菌数,求出三滴样品菌落数平均值,计算出每克粪便中所含的细菌数;每克粪便含菌数=菌落数均值×滴数/ml×稀释倍数。

1.5 细菌的鉴定 **气单胞菌** 菌落圆形,隆起,边缘整齐黄色,直径1.5—2.5mm。**假单胞菌** 菌落圆形,湿润,乳白色,直径1—3mm。**大肠杆菌** 菌落圆形,隆起,边缘整齐,表面光滑,紫黑色,直径2—3mm。**葡萄球菌** 菌落圆形,隆起,粉红色,直径0.5—

表 1 7 种细菌生化特性鉴定结果

Tab.1 Biochemical characteristics of 7 strains of bacteria

项 目 Item	① 气单胞菌	② 假单胞菌	③ 大肠杆菌	④ 葡萄球菌	⑤ 乳酸杆菌	⑥ 双歧杆菌	⑦ 拟杆菌
葡萄糖	6+	6+	6+	6+	4+ 2⊕	6+	3⊕ 3+
甘露醇	6+	6+	6+	6+	4+ 2⊕	6+	4+ 2⊕
麦芽糖	6+	6+	6+	6+	4+ 2-	6+	5+ 1-
蔗糖	6+	6+	6+	6+	6+	5+ 1⊕	6+
棉子糖	6-	6+	6-	4- 2+	3+ 3-	3+ 3-	6+
乳糖	6-	6+	3+ 3-	3+ 3-	2⊕ 4-	3⊕ 3+	3+ 3-
木糖	6-	6+	3+ 3-	2+ 4-	3+ 3-	4+ 2-	5+ 1-
肌醇	6-	6-	6-	6-	6-	6-	5- 1+
鼠李糖	6-	6+	3+ 3-	6-	3+ 3-	4- 2+	5- 1+
卫茅醇	6-	4+ 2-	6-	6-	6-	5- 1+	5+ 1-
甲基红	6+	6+	6+	6+	6+	6+	4+ 2-
吲哚	6-	6-	6-	6-	6-	6-	3+ 3-
V · P	6-	6-	6-	6-	6-	6-	6-
柠檬酸盐	6+	6+	6-	6-	6-	6-	6-
H ₂ S	6-	3+ 3-	6-	6+	6+	6+	4+ 2-
尿素酶	6-	4+ 2-	6-	6+	6+	5- 1+	4- 2+
明胶	6+	6+	6+	6+	6-	3+ 3-	3+ 3-
0 / 129	6-						

注: ①—⑦ 分别为 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *E.coli*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*;

表内数字表示菌株数量, “+”号为产酸, “-”号为不利用, ⊕ 产酸产气

表2 鲤肠道菌群及水中菌群测定结果(\log_{10} / g 粪便)

Tab.2 Measurement of the microflora in the intestine of carp and in the water

结 果 Result	1989年 X±S			X±SX
	9月24日	10月26日	11月10日	
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	7.56±1.63* 5.33**	9.17±1.70 4.75	7.32±1.08 2.49	8.02±1.01 4.19±1.50
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	5.17±0.49 0	4.43±0.3 0	3.26±0.67 0	4.29±0.96 0
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	71±0.09 3.16	5.33±0.34 3.58	6.06±1.44 3.04	6.16±0.89 1.26±0.28
葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	2.71±0.21 2.84	6.31±0.78 2.13	3.82±1.49 2.56	4.28±0.66 2.51±0.36
需氧芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	4.50±0.91 0	4.22±1.00 4.09	3.82±1.33 2.34	4.18±0.34 3.20±1.24
酵母菌 <i>Saccharomyces</i>	7.73±0.93 5.47	8.47±1.71 4.64	6.82±0.86 3.04	7.67±0.82 4.38±1.24
乳酸菌 <i>Lactobacillus</i>	8.60±1.78 0	6.12±1.16 0	4.68±0.96 0	6.47±1.98 0
双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	8.62±1.78 0	5.2±0.62 0	4.93±0.86 0	6.26±2.05 0
拟杆菌 <i>Bacteroides</i>	8.95±0.13 0	9.25±0.87 0	7.79±1.37 0	8.66±0.7 0
厌氧芽孢杆菌 <i>Clostridium</i>	4.99±0.00 0	5.22±0.39 0	2.93±0.43 0	4.38±1.26 0

* 肠道菌数; ** 水中菌数; 差异显著性为 $p > 0.05$ 。

2mm。 需氧芽孢杆菌 菌落边缘不整齐, 不透明, 乳白色, 直径2—3mm。 酵母菌 菌落湿润, 不透明, 乳白色, 直径2—4mm。 乳酸杆菌 菌落扁平, 中心有一蕊突, 边缘不整齐, 暗白色, 直径0.5—1mm。 双歧杆菌 菌落圆形, 隆起, 表面光滑, 湿润, 边缘整齐, 半透明或暗乳白色, 直径1—2mm。 拟杆菌 菌落圆形, 隆起, 湿润, 露珠状, 眼观有一点黄绿色, 直径1—1.5mm。 梭状芽孢杆菌 菌落边缘不整齐, 表面粗糙, 淡黄, 乳白色, 直径2—3mm。

计数菌落的同时, 取单个菌落涂片, 革兰氏染色和镜检。为了判断选择培养基的选择情况, 对气单胞菌、假单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌各任选6个单个菌落作进一步培养和生化鉴定, 各种细菌的生化反应均符合该种细菌标准菌株的主要特征, 说明培养基的选择性良好(表1)。从鲤肠道中分离出的大肠杆菌具有不产生吲哚, 能液化明胶的特征。这与普通大肠杆菌不同, 此结果与Smith所得的结果一致。

2 结果

本试验对不同时间,不同水温条件下,同一养殖池中共 18 尾(每次 6 尾)鲤肠道菌群及水中菌群定量测定结果见表 2。

2.1 在鲤肠道中需氧、兼性厌氧菌的数量依次是:气单胞菌、酵母菌、大肠杆菌、假单胞菌、葡萄球菌、需氧芽胞杆菌。气单胞菌和酵母菌比其它细菌数量更多,可认为是肠道中的优势需氧、兼性厌氧菌。厌氧菌的数量依次是:拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、梭状芽胞杆菌。其中拟杆菌数量最多,可认为是肠道中的优势厌氧菌。

2.2 在饲养鲤的池水中需氧、兼性厌氧菌的数量依次是:酵母菌、气单胞菌。大肠杆菌需氧芽胞杆菌、葡萄球菌、假单胞菌。其中酵母菌、气单胞菌占优势,其次是大肠杆菌和需氧芽胞杆菌、其它两种细菌的数量很少。厌氧菌在水中的数量接近于零。

2.3 对三次所测结果的方差分析表明;气单胞菌、大肠杆菌、需氧芽胞杆菌、酵母菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌、梭状芽胞杆菌均差异不显著($p > 0.05$)。可认为在不同时间、不同温度条件下,同一池塘中鲤肠道内的这些细菌处于相对稳定状态。而假单胞菌、葡萄球菌差异显著($p < 0.05$)。这两种细菌在鲤肠道中的数量可随时间、温度不同而变化。

3 讨论

3.1 关于鱼肠道菌的分布情况, Vanllden, Haruo Sugita 做过一些工作,认为气单胞菌、酵母菌、拟杆菌在鱼肠道中占优势,本实验所得出的结果与此相同,但本试验所测的鱼品种,养殖池,时间均不同。由此可认为:不同品种的鱼类,在不同环境条件下,其肠道中的优势菌较为稳定而且相似。

3.2 对 10 种菌群测定结果可见数量依次是:拟杆菌、气单胞菌、酵母菌、乳酸菌、双歧杆菌、大肠杆菌、假单胞菌、梭状芽胞杆菌、葡萄球菌、需氧芽胞杆菌。这与普通哺乳动物肠道中厌氧菌占绝对优势不同,这可能与鱼的生物特性,特别是消化道中对食物的利用特性与哺乳动物不同有关。鱼进食后各种菌群在肠道中怎样形成厌氧或有氧的生态平衡还有待进一步研究。

3.3 从本实验结果还可看出,水中 10 种菌的数量依次是:酵母菌、气单胞菌、大肠杆菌、需氧芽胞杆菌、葡萄球菌,而假单胞菌和其它厌氧菌几乎为零。水中酵母菌、气单胞菌、大肠杆菌等的存在与饲料不断投入,水中营养条件有关。鱼肠道中的需氧、兼性厌氧优势菌气单胞菌和酵母菌在水中也是优势菌,可推断鱼肠道中的这些优势菌可能来自水中,由水中进入肠道后再大量增殖。

参 考 文 献

- [1] 康 白等。微生态学。大连:大连出版社。1988。
- [2] 徐伯亥等。二龄草鱼肠炎病发病机理。水生生物学报,1989,12(4):308—315。
- [3] Mitsuoka T, et al. The microflora is made from twelve animals. *Am. J. Clin. Nutri.*, 1977, 30: 1799—1810.

[4] Harue S, et al. The Intestinal Microflora of carp, *Cyprinus carpio*, grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Saretherodon niloticus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985, **51**(8): 1325—1329.

[5] Harus S, et al. Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, **53**(2): 287—290.

[6] Harus S, et al. Microflora in the water and sediment of freshwater culture ponds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985, **51**(1): 91—97.

STUDY ON THE INTESTINAL MICROFLORA OF CARP IN FRESHWATER CULTURE PONDS

Wang Hongning, He Mingqing, Liu Ping, Hu Tingxiu and Chen Xiaoye

(Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

Abstract

Qualitative and quantitative investigation was carried out on the intestinal microflora of the common carp in freshwater culture ponds. Ten kinds of normal bacteria were inoculated on various selective media, including *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Staphylo coccus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Clostridium*. The result showed that the predominant taxa of normal microflora in the intestine of carp are *Bacteroides*, *Aeromonas* and *Saccharomyces*. There were significant differences in the numbers of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* at different times and temperatures ($p < 0.05$). No significant difference was found in the numbers of the other eight kinds of normal microflora at different times and temperatures ($p > 0.05$).

Key words Carp, Normal microflora, Microbiology