

黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析*

周金敏^{1,2} 吴志新^{1,2} 曾令兵² 王树云¹ 毕鹏¹ 陈孝煊^{1**}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室/中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000

摘要 对黄颡鱼肠道及所处水体菌群的数量和组成进行了分析。结果显示,黄颡鱼各肠段中好氧和兼性厌氧菌数量的对数值分别为 5.27 ± 0.74 、 6.26 ± 0.36 、 7.56 ± 0.61 。厌氧菌数量远大于好氧和兼性厌氧菌,相差约 2~3 个数量级,双歧杆菌为厌氧菌的优势菌。养殖水体中细菌数量的对数值为 4.80 ± 0.73 ,表明水体中营养盐浓度不高。黄颡鱼肠道与养殖水体中的优势菌基本相同,均为气单胞菌属、肠杆菌科和不动杆菌属。此外,对患细菌性出血病的黄颡鱼肠道菌群的研究结果显示,患病鱼肠道细菌数量显著增加,气单胞菌相比健康黄颡鱼增加 18.3%~33.6%,细菌种类明显减少。表明气单胞菌等重要条件致病菌需要在一定条件下、达到一定的优势度才能体现其致病性。

关键词 黄颡鱼; 肠道; 水体; 菌群

中图分类号 S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0613-05

鱼类肠道菌群是肠道的正常组成部分,是肠道微生物与宿主以及所处的水生环境形成的相互依赖、相互制约的微生物生态系。大量研究结果表明,鱼类肠道菌群在营养物质的消化吸收、免疫反应以及器官的发育等方面具有其他因素不可替代的作用,直接影响到鱼类的生长、发育、生理和病理^[1]。因此,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重视。目前,国内外对鱼类肠道菌群的研究较多^[2-6],但有关黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)肠道菌群的研究还鲜有报道。黄颡鱼是我国近几年推广养殖的名优淡水品种之一,疾病始终是制约其规模化养殖的重要因素^[7-8]。

因此,笔者分析了黄颡鱼肠道和养殖水体中细菌的组成和数量,旨在为进一步深入研究这些肠道微生物在胃肠道特定生态系统中的发生、发展以及变化过程等基本的微生态规律提供理论依据,为采用微生态学方法纠正鱼体肠道菌群失调、增强机体体质、提高抗病力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试鱼及培养基

1) 供试黄颡鱼。试验用健康黄颡鱼采自华中农业大学水产基地(共 5 尾),体质量 30~50 g,剖检时体表、体内无充血、出血现象,肠道充盈度较好且无明显食糜。患细菌性出血病的黄颡鱼采自武汉市南湖养殖场(共 6 尾),体质量 60~80 g。病鱼体表黏液增多,各鳍基部严重充血,肛门红肿、突出,肝脏肿大,剖开后可见肠道轻微充血。

2) 培养基。脑心浸液琼脂培养基(BHI)、BDS 培养基(用于拟杆菌的分离培养)、双歧杆菌 BS 培养基(用于双歧杆菌的分离培养)和 LBS 琼脂培养基(用于乳酸杆菌的分离培养)购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.2 样品采集

样品采集参照陈红莲等^[6]的方法,同时在水族缸中部取养殖水样 500 mL。

1.3 好氧和兼性厌氧菌的分离和鉴定

在黄颡鱼的前、中及后肠部位各取 0.5 g 组织,

收稿日期:2009-12-27; 修回日期:2010-03-09

* 国家科技支撑计划项目(2007BAD37B02)、湖北省“十一五”科技攻关项目(2006AA203A02、2007AA203A01)、中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2010FE03013)资助

** 通讯作者. E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

周金敏,女,1984 年生,硕士研究生. 研究方向:水产微生物学. E-mail: zjm@webmail.hzau.edu.cn

分别按 1:10 (1 g 组织/10 mL) 的比例加入灭菌生理盐水混合,用灭菌匀浆器充分研磨,研磨的样品设为 10^{-1} ,再用灭菌生理盐水对 10^{-1} 样品进行倍比稀释至 10^{-7} ,各稀释度样品均置于涡旋振荡仪上振荡均匀。取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 三个稀释度各 0.1 mL 涂布 BHI 平板,每个稀释度涂布 3 个平板,28 °C 恒温培养 24~28 h。然后选取菌落清晰、分散且菌落数在 30~300 个之间的平板,随机挑取 30~50 个菌落,作为菌株,纯化后接种到 BHI 斜面培养基上,28 °C 培养 24~28 h 后置 4 °C 冰箱中备用。菌种的鉴定参照文献[9]的方法进行。将养殖水样倍比稀释后按相同方法进行细菌的分离和鉴定。

1.4 厌氧菌的分离

样品处理方法与“1.3”方法基本相同。稀释好的样品置于厌氧培养箱中,取 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 三个稀释度样品各 0.1 mL 分别涂布 BHI、BDS、BS 和 LBS 平板。涂布好的平板倒置于 37 °C 厌氧培养箱中培养。为了判断选择培养基的选择情况,各选 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。

1.5 数据的统计和处理

好氧和兼性厌氧菌培养 24~48 h,厌氧菌培养 72 h,取出培养平板,观察记录各平板上的菌落特征,并选择菌落生长疏密适当的稀释度的平板计数。对 3 次重复实验所得的数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 健康黄颡鱼肠道和养殖水体中细菌的数量和组成

黄颡鱼各肠段中细菌的数量详见表 1。其中,后肠的好氧和兼性厌氧菌数量(7.56 ± 0.61)大于中肠(6.26 ± 0.36),而中肠大于前肠(5.27 ± 0.74)。各肠段厌氧菌的数量并未呈现与好氧和兼性厌氧菌相同的趋势,表现为:厌氧菌总数和双歧杆菌数以中肠居多,前肠次之,后肠最少;拟杆菌和乳酸杆菌数以前肠居多,后肠次之,中肠最少。结果还显示,厌氧菌数量远大于好氧和兼性厌氧菌,约相差 2~3 个数量级。双歧杆菌为厌氧菌的优势菌。拟杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌的数量总和只占总厌氧菌数量的

49%左右。对水样菌量的统计结果显示,黄颡鱼养殖水体中细菌数量的对数值为 4.80 ± 0.73 。

表 1 黄颡鱼肠道细菌的数量

Table 1 Numbers of bacteria in the intestinal tract of <i>Pseudobagrus fulvidraco</i>			
菌群 Microflora	前肠 Fore-gut	中肠 Mid-gut	后肠 Hind-gut
好氧和兼性厌氧菌 Aerobic and facultative anaerobic bacteria	5.27 ± 0.74	6.26 ± 0.36	7.56 ± 0.61
厌氧菌 Obligate anaerobic bacteria	8.33 ± 0.34	8.78 ± 0.45	7.92 ± 0.37
拟杆菌 <i>Bacteriodes</i>	4.59 ± 0.58	5.00 ± 0.50	4.83 ± 0.26
双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	8.09 ± 0.36	8.41 ± 0.49	7.69 ± 0.38
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	4.10 ± 0.63	4.81 ± 0.51	4.45 ± 0.24

从黄颡鱼肠道和养殖水体中分离的好氧和兼性厌氧菌的组成见表 2。从前、中、后肠中分别分离到 10、9 和 9 类细菌,在整个肠道中共分离出 11 类细菌(共 485 株),包括芽胞杆菌属、棒杆菌属、葡萄球菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、微球菌属、黄杆菌属、肠杆菌科、产碱菌属、气单胞菌属和弧菌属。黄颡鱼各肠段的优势菌群均为气单胞菌属、肠杆菌科和不动杆菌属。其中,气单胞菌属所占比例约为 1/3 (前肠 29.66%、中肠 36.37%、后肠 33.63%)。从养殖水体中也分离到 9 类细菌(共 166 株)。其中的优势菌群为气单胞菌属、肠杆菌科、不动杆菌属和弧菌属,所占比例分别为 30.82%、19.07%、9.79% 和 9.76%。

2.2 患细菌性出血病的黄颡鱼肠道细菌的数量和组成

患细菌性出血病的黄颡鱼前、中、后肠细菌数量的对数值分别为 5.52 ± 0.86 、 7.57 ± 0.65 和 8.45 ± 0.83 。从患病鱼前、中、后肠中分别分离到 5、5 和 4 类细菌,在整个肠道中共分离出 6 类细菌(共 550 株)(表 3),包括不动杆菌属、肠杆菌科、黄杆菌属、弧菌属、芽胞杆菌属和气单胞菌属。各肠段的优势菌群均为气单胞菌属和肠杆菌科。气单胞菌属所占比例为 47.92%~68.31%,占绝对优势,肠杆菌科所占比例为 10.42%~11.54%。结果显示,患细菌性出血病的黄颡鱼肠道细菌数量显著增加,细菌种类也明显减少。相比健康黄颡鱼,气单胞菌属增加了 18.26%~34.68%。

表2 黄颡鱼肠道和水体中菌群的组成比例¹⁾

Table 2 The proportion of microflora in the tract of *Pseudobagrus fulvidraco* and in the water

菌群 Microflora	前肠 Fore-gut	中肠 Mid-gut	后肠 Hind-gut	水体 Water
芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i>	6.26(2.8~10.2)	1.43(0.3~4.5)	1.05(0.0~3.0)	3.36(0.3~6.7)
棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	—	1.97(0.4~4.5)	2.20(0.0~5.1)	—
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	1.35(0.0~3.9)	—	—	2.45(0.0~4.5)
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	12.39(10.1~17.3)	8.85(2.8~15.7)	14.37(10.2~19.3)	9.79(6.7~15.6)
莫拉氏菌属 <i>Moraxella</i>	4.32(1.6~6.9)	1.39(0.0~3.7)	3.45(0.6~5.9)	7.32(3.5~14.6)
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	1.21(0.0~4.3)	—	—	—
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	8.61(3.2~13.4)	4.70(1.9~8.7)	5.17(1.8~9.2)	6.31(1.5~9.0)
肠杆菌科 Enterobacteriaceae	16.87(12.5~25.0)	26.67(21.8~30.1)	19.24(12.8~24.5)	19.07(15.4~24.2)
产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	6.54(2.6~14.4)	9.56(3.5~16.1)	10.72(6.8~15.1)	3.96(1.6~11.3)
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	29.66(20.8~36.0)	36.37(28.8~41.6)	33.63(26.5~38.2)	30.82(27.4~39.9)
弧菌属 <i>Vibrio</i>	7.94(3.3~14.0)	2.50(0.0~5.5)	4.40(1.6~6.9)	9.76(3.1~13.8)
其他 Others	4.85(2.5~12.9)	6.56(3.3~13.2)	5.77(1.8~9.2)	7.16(2.7~10.4)

1)括号内数据为所占比例的范围,“—”表示未检测到,下表同。Figures with brackets are the proportion of range,“—” means not detected, the same as below.

表3 患细菌性出血病的黄颡鱼肠道菌群的组成

Table 3 The proportion of microflora in the tract of *Pseudobagrus fulvidraco* suffered from hemorrhage disease

菌群 Microflora	前肠 Fore-gut	中肠 Mid-gut	后肠 Hind-gut
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	2.08 (0.0~5.1)	—	4.69 (1.1~7.7)
肠杆菌科 Enterobacteriaceae	10.42 (6.8~14.3)	11.54 (5.5~14.8)	11.06 (9.1~15.3)
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	14.58 (11.7~19.9)	7.69 (2.6~13.4)	—
弧菌属 <i>Vibrio</i>	18.75 (12.8~24.5)	6.85 (1.5~10.1)	8.82 (4.7~13.4)
芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i>	—	1.94 (0.0~5.3)	—
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	47.92 (39.1~53.5)	66.15 (60.3~75.2)	68.31 (62.4~71.8)
其他 Others	6.25 (2.0~12.7)	5.83 (1.1~10.6)	7.12 (2.3~13.1)

3 讨论

据报道,鱼类肠道细菌数量与鱼种类、栖息水域、投饵时间、饵料状况和生理状况等有关。淡水鱼肠内细菌的数量基本在 $10^5 \sim 10^8$ cfu/g^[10]。樊海平等^[11]的研究发现,日本鳗鲡未开口期细菌数量为 10^5 cfu/g,空腹状态下肠道的细菌数量约 $10^3 \sim 10^7$ cfu/g,饱食状态下约 $10^4 \sim 10^8$ cfu/g。本研究发现,黄颡鱼肠道好氧和兼性厌氧菌总数约 10^7 cfu/g,与相关研究结果相近。另外,本试验结果显示,正常黄颡鱼后肠细菌数量较前肠和中肠多,这与相关报道一致^[12]。对于这种现象的产生,Hansen等^[13]推测

由于肠道中部有大量的纤毛上皮细胞,这些细胞将细菌推向肠道的后部。杨雨辉等^[14]认为,营养物质在后肠被充分消化和分解,结果使肠道内容物及其周围环境更有利于微生物的生长繁殖,从而导致后肠细菌数量增多。

对鱼类肠道菌群的组成,国内外已有相关报道。尽管鱼类肠道微生物的组成与遗传、营养和环境因子密切相关,但总体说来,淡水鱼类肠道内好氧和兼性厌氧细菌以气单胞菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、黄杆菌属和肠杆菌科等为主^[15]。Michelle等^[4]采用传统技术和现代分子生物学技术相结合的方法研究了虹鳟肠道内的细菌,结果表明气单胞菌和栖鱼肉杆菌(*Carnobacterium piscicola*)是肠道中的优势菌群。气单胞菌同时也是亚东鲑(*Salmo trutta fario* L.)肠道中的优势菌^[5]。本研究也发现黄颡鱼肠道内气单胞菌检出率最高,约占好氧和兼性厌氧菌总数的1/3,同时肠杆菌科和不动杆菌属的细菌数量也较多,可以认为它们是黄颡鱼肠道内的优势菌群和固定菌群。

水细菌是水域生态系统重要的矿化者,同时也作为初级生产力成为部分微型浮游动物的饵料,其活跃的代谢促进了系统中的物质循环和能量流动,维系着一个系统的正常运转。有研究表明,淡水鱼和海水鱼肠道中的优势菌分别与淡水和海水水体中的优势菌(好氧和兼性厌氧)类似,在淡水水体及淡水鱼肠道中气单胞菌及肠杆菌为优势菌群,而海水及海水鱼肠道中优势菌主要为弧菌^[2]。从本试验结

果可看出,养殖水体中的优势菌为气单胞菌属、肠杆菌科、不动杆菌属和弧菌属。黄颡鱼肠道中的好氧和兼性厌氧优势菌在相应的养殖水体中也是优势菌,可推断鱼肠道中的这些细菌可能来自水中,由水中进入肠道后再大量增殖。水中细菌的存在与饲料不断投入、水中营养密切相关。本结果显示养殖水体中的微生物多样性指数较高,说明系统相对较稳定^[16]。此外,养殖水体中细菌数量的对数值(4.80±0.73)偏低,表明这一未经施肥的系统中营养盐浓度不高。

尽管肠道中的厌氧菌和低等脊椎动物的关系尚需深入研究,但它们对维持鱼类个体的健康确实发挥着重要作用。王红宁等^[17]研究了淡水养殖池中鲤的肠道菌群结构,发现鲤肠道中厌氧菌的数量依次是:拟杆菌、乳酸杆菌、梭状芽孢杆菌。Rachel等^[18]对 3 种鱼类肠道中厌氧菌的产酶活性进行了研究。结果显示,漠斑牙鲈(*Paralichthys lethostigma*)肠道中只存在梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*),而神仙鱼(*Pterophyllum scalare*)和地图鱼(*Astronotus ocellatus*)中除梭状芽孢杆菌属外,还存在梭菌属(*Fusobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和卞淋菌属(*Porphyromonas*)。这些厌氧菌均能表现出多种不同程度的产酶活性。本试验中,双歧杆菌为黄颡鱼肠道的厌氧优势菌。这些结果表明厌氧菌对宿主具有种属特异性,鱼的种类不同,肠道中的优势厌氧菌种类也不同。本研究还发现,拟杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌的数量只占总厌氧菌的 49% 左右,说明在黄颡鱼的肠道中还存在其他种类的厌氧菌,有待进一步研究确定。

对养殖生物而言,细菌性疾病的暴发往往与细菌生态平衡出现异常密切相关^[7,19]。鱼肠道中微生物主要是作为共生或共栖者存在,肠道内的细菌同宿主的肠道环境相互作用。宿主利用各种防御机制将细菌的种类和数量控制在一定的水平,以保证生物体的健康。徐伯亥等^[20]对患肠炎草鱼和正常草鱼肠道中的气单胞菌进行了比较研究,结果发现草鱼患肠炎时该菌的数量是健康时的 $10^2 \sim 10^3$ 倍,从而推断草鱼肠炎的发病机理与气单胞菌大量繁殖引起肠机能的紊乱有关。本试验中,患细菌性出血病的黄颡鱼肠道细菌数量显著增加,气单胞菌相比健康黄颡鱼增加了 17%~35%,细菌种类也明显减少,这也再次证明了气单胞菌等重要条件致病菌需要在一定条件下、达到一定的优势度才能体现

其致病性。同时,细菌种类减少可能是由气单胞菌大量繁殖造成它对其他菌的拮抗作用增强引起的。

参 考 文 献

- [1] 黄光祥. 养殖鱼肠道菌群分子生态的研究[D]. 武汉:华中农业大学水产学院,2008.
- [2] 覃映雪,王晓林,鄢庆彬,等. 青石斑鱼肠道菌群研究[J]. 海洋水产研究,2007,28(5):18-23.
- [3] 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]. 中国微生物学杂志,2007,19(3):268-272.
- [4] MICHELLE J P, DAVID M S, DAVID J A. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture,2006,261:194-203.
- [5] VESTA S A, ANIOLAS S A, DALIUS B. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis [J]. Fisheries Science,2006,72:597-602.
- [6] 陈红莲,吴志新,陈孝煊,等. 投喂甲基盐霉素对鲤肠道菌群的影响[J]. 华中农业大学学报,2006,25(4):431-435.
- [7] 丁正峰,薛晖,边文冀,等. 养殖黄颡鱼腹水症病原研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(5):639-643.
- [8] 廖勋波,张明. 黄颡鱼常见疾病及防治方法[J]. 江西农业学报,2007,19(10):118-120.
- [9] 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.
- [10] SUGITA H, OSHIMA K, TAMURA M. Bacterial flora in the gastrointestinal tract of freshwater fishes in the river [J]. Bull Japan Soc Sci Fish,1983,49(9):1387-1395.
- [11] 樊海平,曾占壮,林煜,等. 养殖的日本鳗鲡肠道中细菌的数量和组成[J]. 台湾海峡,2005,24(4):515-519.
- [12] 刘红柏,张颖,杨丽辉,等. 5 种中草药作为饲料添加剂对鲤体内细菌及生长的影响[J]. 大连水产学院学报,2004,19(1):6-20.
- [13] HANSEN G H, STREM E, OLAFSEN H A. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae [J]. Appl Environ Microbiol,1992,58:461-470.
- [14] 杨雨辉,佟恒敏,卢彤,等. 乳酸环丙沙星对鲤鱼肠道菌群的影响[J]. 中国兽医杂志,2003,39(10):38-40.
- [15] GOMEZ G D, BALCAZAR J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish [J]. FEMS Immunol Med Microbiol,2008,52(2):145-154.
- [16] 王瑞旋,王江勇,徐力文,等. 军曹鱼肠道及水体异养菌和弧菌的周年变化[J]. 中国水产科学,2008,15(6):1009-1014.
- [17] 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.
- [18] RACHEL F R, BEVERLY A D. Enzyme production by ob-

ligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) [J]. Aquaculture, 2003, 227: 417-426.

[19] 王瑞旋, 徐力文, 冯娟. 海水鱼类细菌性疾病病原及其检测、疫苗研究概况[J]. 南方水产, 2005, 1(6): 72-79.

[20] 徐伯亥, 葛蕊芳, 熊木林. 二龄草鱼肠炎发病机理[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 308-315.

Microflora in Digestive Tract of Yellow Catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the Water

ZHOU Jin-min^{1,2} WU Zhi-xin^{1,2} ZENG Ling-bing²

WANG Shu-yun¹ BI Peng¹ CHEN Xiao-xuan¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Aquaculture/Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China

Abstract Microflora in the digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water were studied in this paper. Results showed that: the logarithm of aerobic and facultative, anaerobic bacteria of foregut, midgut and hindgut were 5.27 ± 0.74 , 6.26 ± 0.36 , 7.56 ± 0.61 , respectively. Obligate anaerobic bacteria numbers were 2 to 3 orders of magnitude more than the other two kinds with *Bifidobacterium* the dominant species. The logarithm of bacteria in water was 4.80 ± 0.73 . It indicated that the concentration of nutrients were not very high. *Aeromonas*, Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* were dominant species in the digestive tract of fish. They were also dominant species in water. In addition, the number of bacteria in the digestive tract of *Pseudobagrus fulvidraco* suffered from hemorrhage disease significantly increased. *Aeromonas* increased 18.3%~33.6%. And bacteria species decreased significantly. It showed that the opportunistic pathogens can cause diseases only in certain conditions and based on quantitative superiority.

Key words yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*); intestinal tract; water; microflora

(责任编辑: 边书京)