



大鼠与鲫鱼肠道内含物中微生物菌群的研究*

陈芳梅 李伟 刘蔚 于源华 王子琛 张鹏宇 张贵林

(长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022)

摘要:目的 对生活环境差异较大的动物肠道内含物中微生物菌群分布规律进行研究。方法 通过提取SD大鼠与鲫鱼不同肠段的内含物菌液,用不同的选择性培养基进行分离培养,鉴定后进行平板计数。结果 大鼠肠道中乳酸杆菌所占比重高于鲫鱼肠道,其余菌落(双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌)比重明显小于鲫鱼肠道;大鼠和鲫鱼肠道厌氧的双歧杆菌沿肠道向下数量递增。需氧的肠球菌在鲫鱼、大鼠整个肠道中的数量级相当。结论 研究不同动物肠道的微生物信息可以为病理学、毒理学的研究提供理论信息。

关键词: 鲫鱼;大鼠;肠道微生物;分离;鉴定

中图分类号: Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0048-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.010

肠道菌群数量庞大,整个基因总数约为人类的150倍,近年来,随着“人类微生物组计划”、“肠道元基因组计划”等研究项目的开展,人类对肠道菌群的关注达到了空前的高度^[1-3]。随着对其结构和功能的不断探索,人们发现肠道菌群与宿主健康密切相关,被认为是人体的“微生物器官”^[4]。已有研究表明肠道微生物与肝硬化、肥胖、艾滋病,甚至是心理疾病的发生都有密切的关系^[5-8]。肠道微生物与宿主之间存在着肠道微生态平衡,这种平衡一旦被打破,宿主就极易遭受各种疾病的困扰^[9]。深入研究肠道微生物与肠道微生态平衡对促进人体健康以及人类和动物疾病防治等具有重要意义。

本实验研究生存环境差异极大的两种动物肠道不同部位中微生物的分布情况,为更深入地研究肠道健康与肠道微生物的关系以及为本课题组的毒理学实验研究提供相关的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

鲫鱼(423~490)g,成年雄鱼,夏季,气温15~30℃,研究对象与本课题组的肠道微生物组学研究

保持一致,购买自吉林省长春市新立城彦轩养殖场。

SD大鼠(144~164)g,7周龄,雄性,清洁级,购买自吉林大学实验动物中心(SCXK(辽)2015-0001)。

1.2 试剂

大肠杆菌选择培养基(EMB)、卡那霉素ELB选择培养基^[10]、乳酸杆菌选择培养基(Lbs)、双歧杆菌选择培养基,蛋白胨水培养基,胆汁-七叶苷培养基,快速革兰染色液等,购买自宝泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器与设备

小型高速冷冻离心机(5424R)、电热恒温培养箱(DNP-9082)、电子显微镜(CX40)、气浴恒温振荡器(THZ-92A)、50 mL容量离心机(1736R)等。

1.4 方法

1.4.1 肠道内容物的获取和菌液制备:随机选取3只SD大鼠处死,消毒后置于超净台,取出空回肠、盲肠以及结肠的肠道内容物各1g,根据已发表文献^[11]制备肠道菌液。

随机选取3条鲫鱼处死,消毒后置于超净台,取出前肠、中肠以及后肠的肠道内容物各1g,根据已发表文献^[11]制备肠道菌液。

收稿日期:2018-06-24

* 基金项目:长春理工大学青年基金项目(No.XQNJJ-2016-16);吉林省大学生创新创业训练计划项目(No.2017S065)

作者简介:陈芳梅(1992—),女,硕士研究生,研究方向:微囊藻毒素对肠道微生物的影响。E-mail: 2360116552@qq.com

通信作者:李伟(1986—),女,博士,讲师,研究方向:微囊藻毒素的降解与代谢。E-mail: liwei5695084@163.com

1.4.2 菌液稀释与平板计数: 各段肠道每克内容物菌液稀释倍数分别是: 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 涂布于各选择培养基上, 每个浓度三个重复。37 °C 恒温培养, 双歧杆菌、乳酸杆菌 37 °C 厌氧培养 48 h, 肠球菌、大肠杆菌 37 °C 好氧培养 24 h。长菌后通过菌落形态、革兰染色、镜检以及各种生化反应等鉴定, 并进行菌落计数, 计算每克湿肠道内容物中的菌数, 即 CFU/g 标本。

公式: $\text{CFU/g 标本} = X \times 10 \times \text{稀释倍数}$, (X 表示计数平板菌落平均数)

1.5 统计方法

将计数结果换算成 $\log \text{CFU/g}$ 建库, 数据用“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS 17.0 统计软件做 t 方差检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 菌落鉴定

通过对平板菌落特征、菌落形态、生化反应以及革兰染色后(如图 1 和图 2), 确定所培养菌群为双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌和大肠杆菌。

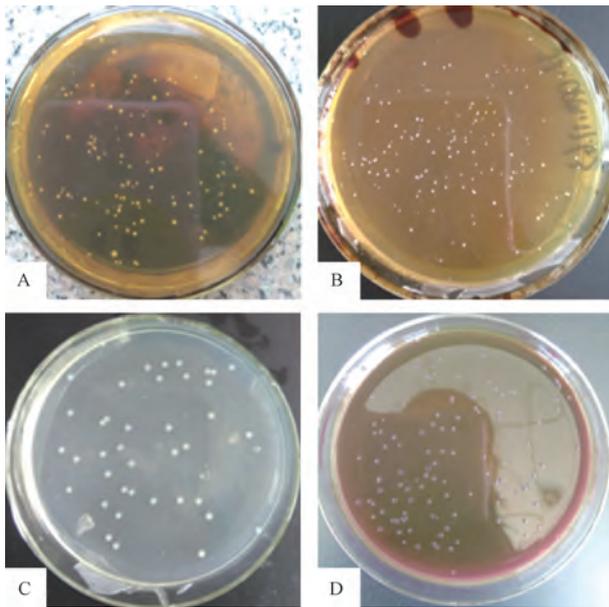


图 1 部分平板培养图

注: A: 双歧杆菌; B: 乳酸杆菌; C: 肠球菌; D: 大肠杆菌

Fig.1 Part of the plate culture diagram

Note: A: *Bifidobacterium*; B: *Lactobacillus*;

C: *Enterococcus*; D: *Escherichia coli*

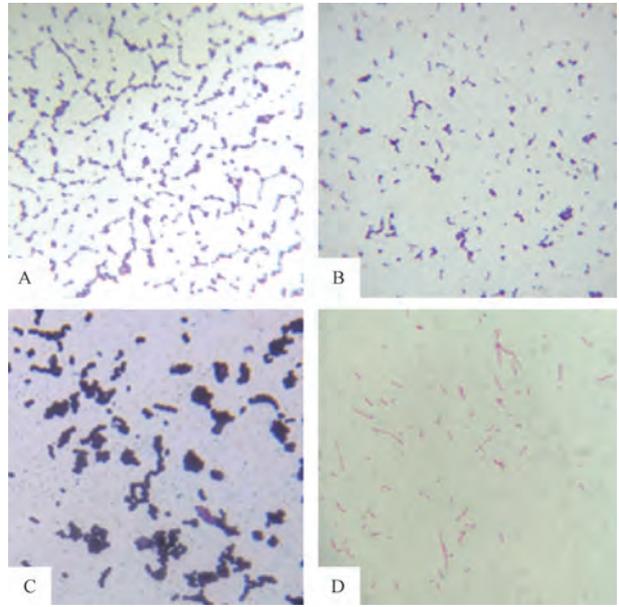


图 2 革兰染色结果 $\times 1000$

注: A: 双歧杆菌; B: 乳酸杆菌; C: 肠球菌; D: 大肠杆菌

Fig.2 Gram staining results $\times 1000$

Note: A: *Bifidobacterium*; B: *Lactobacillus*;

C: *Enterococcus*; D: *Escherichia coli*

2.2 数据分析

大鼠不同肠段的同种菌群相比, 厌氧菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)沿肠道向下数量递增, 且有显著差异($P < 0.05$)。需氧菌(肠球菌、大肠杆菌)在盲肠内的数量较其它肠段多, 且有显著差异($P < 0.05$)。各肠段总菌数也沿肠道向下依次递增。表 1 中不同菌群的同肠段相比, 各肠段中, 厌氧双歧杆菌数量最多, 其次为厌氧乳酸杆菌, 二者与大肠杆菌、肠球菌数量相比有显著差异($P < 0.05$)。在整个肠道中厌氧的双歧杆菌、乳酸杆菌总数比肠球菌、大肠杆菌总数高 2~3 个数量级, 见表 1。

鲫鱼不同肠段的同种菌群相比, 双歧杆菌、肠球菌以及大肠杆菌数量沿肠道向下增加。各肠段总菌数沿肠道向下也依次递增。表 2 不同菌群的同肠段相比, 各肠段中, 厌氧的双歧杆菌数量最多, 比需氧的大肠杆菌、肠球菌数量高出 1~2 数量级, 有明显的统计学差异($P < 0.05$)。同为厌氧的乳酸杆菌数量却比需氧大肠杆菌小 1~2 个数量级, 与肠球菌相比, 除中肠段数量相差最小, 其余肠段也小 1~2 个数量级。整个鲫鱼肠道中各菌群总数从多到少依次为双歧杆菌、大肠杆菌、肠球菌以及乳酸杆菌, 且厌氧菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)总数也大于需氧菌(肠球菌、大肠杆菌)总数, 见表 2。

表 1 SD 大鼠肠道菌群计数(菌落计数转换为 lg 值, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)Table 1 Intestinal microflora count in SD rats (Colony count was converted to lg value, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)

肠段	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌	总计
空回肠	7.452±0.047 ^a	6.513±0.154 ^b	5.350±0.053 ^c	5.151±0.196 ^d	7.508
盲肠	8.245±0.051 ^b	7.131±0.126 ^c	6.120±0.095 ^a	6.032±0.083 ^a	8.248
结肠	9.062±0.070 ^c	8.824±0.090 ^a	4.658±0.174 ^b	5.220±0.063 ^d	9.265
总计	9.136	8.841	6.206	6.148	9.315

注:如果数据在同一行或同一列中用不同的字母表示(a,b,c,d),则存在显著性差异($P < 0.05$),如果同一行或同一列中有相同的字母表示(a,b,c,d),则没有显著差异($P > 0.05$)

Note: There is significant difference ($P < 0.05$) if the data are labeled with different letters (a,b,c,d), and no significant difference ($P > 0.05$) if with the same letters (a,b,c,d) in the same line or in the same column

表 2 鲫鱼肠道菌群计数(菌落计数转换为 lg 值, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)Table 2 Intestinal microflora count in crucian carp (Colony counts were converted to lg values, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)

肠段	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌	总计
前肠	7.337±0.127 ^a	3.709±0.066 ^b	5.002±0.065 ^c	5.326±0.064 ^d	7.354
中肠	7.392±0.139 ^a	5.466±0.093 ^d	5.118±0.069 ^b	6.493±0.071 ^c	7.463
后肠	8.044±0.070 ^c	5.379±0.051 ^d	6.072±0.042 ^a	6.853±0.029 ^b	8.080
总计	8.203	5.733	6.151	7.021	8.235

注:如果数据在同一行或同一列中用不同的字母表示(a,b,c,d),则存在显著性差异($P < 0.05$),如果同一行或同一列中有相同的字母表示(a,b,c,d),则没有显著差异($P > 0.05$)

Note: There is significant difference ($P < 0.05$) if the data are labeled with different letters (a,b,c,d), and no significant difference ($P > 0.05$) if with the same letters (a,b,c,d) in the same line or in the same column

在大鼠、鲫鱼肠道中,厌氧的双歧杆菌所占比例最多,且在鲫鱼肠道中双歧杆菌所占比例(92.76%)远高于大鼠肠道中的相应比例(66.24%)。而同为厌氧菌的乳酸杆菌在鲫鱼肠道中的比例(0.32%)远低于大鼠肠道中的比例(33.61%)。鲫鱼肠道中的需氧菌(肠球菌和大肠杆菌)在肠道总菌中所占的比例也远高于大鼠肠道中的比例,见表3。

表 3 大鼠和鲫鱼肠道微生物分布比例(%)

Table 3 Distribution of intestinal microflora in rats and crucian carp (%)

实验动物	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌
大鼠	66.24%	33.61%	0.08%	0.07%
鲫鱼	92.76%	0.32%	0.82%	6.10%

3 讨论

已有研究表明肠道微生物在肠道不同区域的分布有所不同,以便适应不同肠段的环境或者促进其功能^[12-13]。因此将大鼠和鲫鱼肠道进行分段取样,发现大鼠空回肠及鲫鱼前肠段的各菌总数最少,盲肠及中肠次之,而结肠和后肠段各菌总数最高,这一结果与之前的研究是一致的,即肠道中微生物的密

度沿肠道向下是逐渐增加的^[14-15]。

实验将鲫鱼和大鼠肠道中各菌总数进行对比,发现大鼠肠道中乳酸杆菌所占比重远高于鲫鱼肠道,同时大鼠肠道中双歧杆菌、肠球菌以及大肠杆菌所占比重都明显小于鲫鱼肠道。这可能是乳酸杆菌引起的,乳酸杆菌作为肠道益生菌之一,有研究表明乳酸杆菌的分泌产物能改变革兰阳性菌细胞膜的通透性从而抑制阳性菌的生长,同时降低肠道 pH,抑制大肠杆菌及梭菌等的生长^[16]。实验结果中鲫鱼肠道中乳酸杆菌数量与尹军霞等^[17]发表的结果有一定差异,这可能因为温度的原因。已有研究表明鲫鱼肠道内的乳酸杆菌也会因季节变化而发生改变,主要是与温度有关。

无论陆生哺乳动物大鼠,还是淡水卵生动物鲫鱼,其各肠段中有益菌(乳酸杆菌和双歧杆菌)的总数量都要明显高于条件致病菌(肠球菌和大肠杆菌)的总数量。鲫鱼、大鼠整个肠道中需氧的肠球菌的数量级相当。大鼠、鲫鱼肠道中双歧杆菌的数量沿着肠道向下是逐渐增加的,肠道总菌数也沿肠道向下逐渐增加。大鼠肠道中只有乳酸杆菌所占比重高于鲫鱼肠道,其余菌落(双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌)比重都明显小于鲫鱼肠道。通过本实验揭示了不同动物的不同肠段中肠道微生物的分布呈现

各自的规律,为深入研究肠道健康与肠道微生物之间关系提供理论信息。

参考文献

- [1] 傅佑丽. 微生物:下一个人类基因组计划[J]. 世界科学, 2007,(6):7-8.
- [2] 魏晓,刘威,袁静,等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2011, **23**(1):75-80.
- [3] Zoetendal E G, Rajilic-Stojanovic M, De-Vos W M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota [J]. Gut, 2008, **57** (11): 1605-1615.
- [4] 翟齐啸,田丰伟,王刚,等. 肠道微生物与人体健康的研究进展[J]. 食品科学, 2013, **34**(15):337-341.
- [5] Liu J, Wu D, Ahmed A, *et al.* Comparison of the Gut Microbe Profiles and Numbers Between Patients with Liver Cirrhosis and Healthy Individuals[J]. Curr Microbiol, 2012, **65**(1):7-13.
- [6] 陈恒,叶盛,左延文,等. 肠道微生物与肥胖关系研究进展[J]. 现代预防医学, 2008, **35**(4):608-609.
- [7] 王腊梅,孔祥阳,王昆华. 肠道菌群与艾滋病关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, **32**(6):859-862.
- [8] 蔡林彬,付轶群,李明阳,等. 肠道微生物群与精神疾病的关系[J]. 国际生物制品学杂志, 2014, **37**(5):232-237.
- [9] 梁效,彭喜春. 饮食、肠道微生物与人体健康[J]. 肠外与肠内营养, 2011, **18**(5):304-306.
- [10] 强华,王耿夏,谢蔓凌. 卡那霉素 ELB 选择培养基分离肠道肠球菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, **13**(2):145-145.
- [11] 蒋婕,郭抗萧,周赛男,等. 一种提取小鼠肠道中活体微生物的方法[J]. 中国微生物学杂志, 2013, **25**(5):512-515.
- [12] Liu J, Wu D, Ahmed A, *et al.* Comparison of the gut microbe profiles and numbers between patients with liver cirrhosis and healthy individuals[J]. Curr Microbio, 2012, **65**(1):7-13.
- [13] Tian Y, Zhang L, Wang Y, *et al.* Age-related topographical metabolic signatures for the rat gastrointestinal contents. [J]. J Proteome Res, 2012, **11**(2):1397-411.
- [14] Goel A, Gupta M, Aggarwal R. Gut microbiota and liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, **29**(6):1139-1148.
- [15] Mei W, Ahm  S, Jeppsson B, *et al.* Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes[J]. Fems microbiol Ecol, 2005, **54**(2):219-231.
- [16] Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, *et al.* Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. [J]. Aquaculture, 2004, **234**(1-4):335-346.
- [17] 尹军霞,陈瑛,孟丽丽. 益生菌剂对鲫鱼肠道菌群影响的初步研究[J]. 水产科学, 2007, **26**(11):610-612.

Study of Intestinal Flora in Rat and Crucian Carp

CHEN Fangmei, LI Wei, LIU Wei, YU Yuanhua, WANG Zichen, ZHANG Pengyu, ZHANG Guilin

(School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China)

Abstract: Objective The distribution of intestinal microflora in different parts of animals, intestine which living environment are quite different. **Method** With taking the contents of different intestinal segments of mice and crucian carp, extracting and culturing with different selective medium, and then carrying out the plate count. **Result**

It was found that the proportion of *Lactobacillus* in the intestine of rats was higher than that of crucian carp, and the proportion of other colonies (*Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*) was significantly smaller than that of crucian carp. The distribution of intestinal anaerobic *Bifidobacterium* in rats and crucian carp increase in the downward direction along the gut. The magnitude of aerobic *Enterococcus* in the intestine of rats and crucian carp was almost same. **Conclusion** The inestinal microbiological information of different animals can provide some experimental basis for the study of pathology and toxicology.

Key words: crucian carp; rat; intestinal microbiology; isolation; identification