

生长猪胃肠道乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌的数量和分布规律

高巍 孟庆翔 肖训军 夏兆刚

(中国农业大学动物科技学院)

摘要 本研究采用严格的厌氧微生物培养方法,对5头生长猪进行了测定。结果表明,在生长猪的胃肠道内容物中和粘膜上均有相当数量的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌分布,且乳酸菌的数量显著高于其他2种菌($P < 0.01$)。3类菌在内容物中的分布为:乳酸菌在猪后肠内容物中的数量分布显著高于胃和小肠($P < 0.01$);双歧杆菌在盲肠内容物中数量最高($P < 0.01$);而盲肠和结肠内容物中大肠杆菌的数量分布大于其他部位($P < 0.01$)。粘膜上的分布为:乳酸菌在结肠、双歧杆菌和大肠杆菌在盲肠粘膜上的数量分布显著高于其他各区段($P < 0.05$)。猪胃肠道各区段中,除直肠内容物中双歧杆菌的数量显著高于大肠杆菌外($P < 0.01$),其他各区段中2种菌的数量统计差异不显著($P > 0.05$);结肠和直肠粘膜上双歧杆菌的数量显著高于大肠杆菌($P < 0.05$)。

关键词 胃肠道微生物;乳酸菌;双歧杆菌;大肠杆菌;生长猪

中图分类号 S852.6; S828

Numeration of Lactic Acid Producing Bacteria, *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* Populations in Gastrointestinal Tract of Growing Pig

Gao Wei Meng Qingxiang Xiao Xunjun Xia Zhaogang

(College of Animal Science and Technology, CAU)

Abstract A study was conducted to determine the number of lactic acid producing bacteria, *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* in the gastrointestinal contents and associated with mucus layers of various segments (gastric, small-intestine, cecum, colon and rectum) of growing pigs. Results showed that there were significant bacterial populations presenting in gastrointestinal contents and mucus layers along the whole gastrointestinal tract. Furthermore, the population of lactic acid producing bacteria presented both in gastrointestinal contents and associated with mucus layers was significantly higher than that of *Bifidobacteria* or *E. coli* ($P < 0.01$). The distribution of the three groups in the contents of the whole tract was: the number of lactic acid producing bacteria in the hindgut contents was significantly higher than that of gastric or small-intestine ($P < 0.01$); the populations of *Bifidobacteria* in the cecum contents was the greatest ($P < 0.01$); the concentration of *E. coli* in the contents of cecum and colon was higher than that of other segments ($P < 0.01$). The distribution of the three groups associated with the gastrointestinal mucus layers was:

收稿日期: 2001-03-12

国家自然科学基金资助项目(39870589)

孟庆翔,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

the populations of Lactic acid-producing bacteria in colon, *Bifidobacteria* or *E. coli* in cecum and colon were significantly greater than that of other segments of gastrointestinal tract ($P < 0.05$). There was no significant difference of the populations between *Bifidobacteria* and *E. coli* in the gastrointestinal contents except in the rectum. The numbers of *Bifidobacteria* associated with the colon and rectum mucus layers were significantly higher than that of *E. coli* ($P < 0.05$).

Key words normal gastrointestinal bacteria; lactic acid-producing bacteria; *Bifidobacteria*; *Escherichia coli*; growing pig

乳酸菌和双歧杆菌为动物消化道内的正常寄生菌,而嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 和假长双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudolongum*) 为猪消化道内革兰氏阳性菌的优势菌种^[1,2],在动物的营养、免疫、防病等各方面发挥着重要的作用。大肠杆菌、链球菌及产气荚膜梭菌等是最早在仔猪消化道内定植的细菌^[3],大肠杆菌也被认为是猪消化道内的正常菌,但有些菌株却是引起仔猪发生下痢的重要病原。因而,研究猪的消化道微生物区系中此3类菌的数量和变化规律,特别是粘膜上附着的此3类菌的数量和变化规律,为进一步研究它们之间以及其与宿主、病原微生物以及肠道其他固有菌之间的微生态关系奠定理论依据。国外虽然对猪消化道不同区段内此3类菌的数量进行了较多的研究,但对生长猪的消化道不同区段内容物中和粘膜附着的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌的数量和分布缺乏较系统的研究。为此,本试验对生长猪消化道的胃、小肠、盲肠、结肠和直肠内容物中和粘膜附着的此3类菌的数量和分布规律进行了研究。

1 材料与方法

1.1 动物和日粮

5头45日龄长白×大白生长猪,每日饲喂玉米-豆粕型日粮2次,单圈饲养。日粮组成及营养成分见表1。日粮中不含有任何抗生素类药物。经过1个月的饲喂期后,5头猪生长发育健康良好,未发生过消化道疾病。消化道微生物区系已适应该试验环境和日粮。

1.2 微生物培养基的配方及制作方法

麦康凯琼脂(北京市海淀区微生物培养基制品厂)的制作按产品说明中的方法进行。

MRS的配方见Mann等^[4];双歧杆菌的选择

性培养基(增强梭菌培养基RCA和NNL溶液)的配方见Am等^[5]。按Hungate^[6]的方法厌氧制作MRS和RCA。RCA培养基灭菌并冷却至适温后,在厌氧培养箱(Forma Scientific, Model 1025)内每100 mL RCA加5 mL NNL溶液(每100 mL蒸馏水加氯化锂6.0 g、硫酸新霉素0.2 g、萘啶酮酸0.03 g、0.2 μm过滤除菌)混匀后倒平皿。厌氧稀释液的配方及制作按Bryant和Burkey^[7]方法,所用试剂均购自Sigma公司。

表1 饲料配方及营养成分

日粮配方	w / %	营养成分	w / %
大豆粕	15.5	消化能MJ·kg ⁻¹	13.4
小麦麸	8.5	粗蛋白	15
玉米	73.0	钙	0.6
石粉	1.0	磷	0.5
食盐	0.23	蛋+胱	0.38
矿-维预混料	1.0	赖氨酸	0.75
赖氨酸	0.09	食盐	0.23
磷酸氢钙	0.8		

1.3 采样与接种

5 头猪分批单个屠宰。屠宰时的平均体重为 (24.2 ± 1.3) kg。屠宰前 1 天饲喂量减半。早晨饲喂前, 每头猪肌肉注射 2 支 15% 复方噻唑酮针剂, 麻醉后称重, 剖腹, 按高巍和孟庆翔^[8]的方法进行不同区段内容物和粘膜的采样。采样后立即在厌氧条件下倍比稀释并在厌氧培养箱内接种麦康凯、MRS 和 RCA 3 种培养基, 用以分离培养大肠杆菌、乳酸菌和双歧杆菌。内容物接种稀释度为 $10^{-3} \sim 10^{-8}$, 粘膜接种稀释度为 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ 。接种和培养的方法按高巍和孟庆翔^[8]方法进行。同时测定内容物的干重和刮取粘膜的面积。

1.4 细菌计数

选菌落生长疏密适当的稀释度计菌数, 求出 5 滴样品菌落形成单位 (cfu) 平均值, 各相细菌的菌落形成单位 (cfu) = 菌落数均值 $\times 40 \times$ 稀释倍数。

1.5 统计分析

所有试验数据均利用 ANOVA 方法进行方差分析及 t 检验^[9]。

2 结果

2.1 猪胃肠道内容物中乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌的数量变化

在整个猪的消化道内容物中, 均存在一定数量的双歧杆菌、大肠杆菌和乳酸菌, 且乳酸菌为优势菌, 其数量高出双歧杆菌和大肠杆菌 100 倍以上 ($P < 0.01$, 表 2)。除直肠内容物中双歧杆菌的数量显著高于大肠杆菌外 ($P < 0.01$), 其他各区段内容物中, 虽然双歧杆菌的数量在数值上大于大肠杆菌, 但统计上差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 类菌在生长猪的整个消化道内容物中的数量分布均存在一致的规律性, 即后肠(盲肠、结肠和直肠)内容物中的数量明显高于胃和小肠。统计分析表明, 盲肠内容物中双歧杆菌的数量显著高于其它部位 ($P < 0.01$)。盲肠和结肠内容物中大肠杆菌的数量显著高于胃、小肠和直肠 ($P < 0.01$), 而后肠内容物中乳酸菌的数量显著高于胃和小肠 ($P < 0.01$)。

表 2 生长猪胃肠道内容物中 3 类菌的数量

菌 群	胃	小 肠	盲 肠	结 肠	直 肠
双歧杆菌	2.5 \pm 0.3 ac	42.6 \pm 16.9 ac	891.7 \pm 323.1 bd	116.6 \pm 31.1 a	351.0 \pm 99.7 a
大肠杆菌	2.0 \pm 0.3 ac	8.6 \pm 2.9 ac	113.3 \pm 23.0 bd	80.7 \pm 16.0 ad	21.3 \pm 5.5 c
乳酸菌	35.1 \pm 7.8 e	29.1 \pm 5.1 e	252.9 \pm 59.0 f	380.6 \pm 61.1 f	368.5 \pm 84.6 f

注: 表中相同栏或列中数值具不同上标者差异显著 ($P < 0.05$);

双歧杆菌、大肠杆菌的数量表示为平均值 \pm 标准误 $\times 10^6$ cfu \cdot g⁻¹ (DW), 乳酸菌为平均值 \pm 标准误 $\times 10^8$ cfu \cdot g⁻¹ (DW)。胃肠道各区段内容物的干重分别为: 胃 (29.6 \pm 2.8) %、小肠 (14.4 \pm 1.3) %、盲肠 (12.0 \pm 1.0) %、结肠 (20.0 \pm 1.8) %、直肠 (24.9 \pm 0.4) %。

2.2 胃肠道粘膜附着的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌的数量变化

胃肠道不同区段粘膜中乳酸菌的数量显著高于双歧杆菌和大肠杆菌 ($P < 0.01$, 表 3)。各区段粘膜中双歧杆菌和大肠杆菌的数量分布为: 结肠和直肠粘膜中双歧杆菌的数量显著高于大肠杆菌 ($P < 0.05$), 而胃、小肠和盲肠粘膜中 2 种菌的数量差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 类菌在生长猪胃肠道不同区段粘膜中的分布情况不同。双歧杆菌在盲肠粘膜中的数量

最高($P < 0.01$), 5头猪平均为 $5.0 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$; 其次是胃粘膜, 但与其他区段间差异不显著($P > 0.05$)。大肠杆菌的分布规律与双歧杆菌相似, 盲肠粘膜中的数量最高($P < 0.01$), 平均为 $2.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$; 其次是胃粘膜, 小肠粘膜中的数量较低, 而结肠和直肠粘膜中的数量显著低于双歧杆菌($P < 0.05$); 结肠粘膜中乳酸菌的数量平均为 $5.4 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$, 显著高于其它各区段($P < 0.01$); 胃粘膜中也存在相当数量的乳酸菌, 而小肠粘膜中的数量最低。

表3 生长猪胃肠道粘膜中3类菌的数量

菌群	胃	小肠	盲肠	结肠	直肠
双歧杆菌	197.2 ± 87.9 ac	3.1 ± 0.8 ac	498.0 ± 177.8 bd	26.5 ± 9.8 ac	12.4 ± 4.5 ac
大肠杆菌	187.7 ± 79.9 acbd	1.6 ± 0.5 acbd	249.1 ± 106.1 ef	4.0 ± 1.1 bd	0.3 ± 0.04 bd
乳酸菌	118.8 ± 44.1 g	0.4 ± 0.07 g	75.3 ± 26.4 g	541.8 ± 222.5 h	8.7 ± 2.0 g

注: 同表2;

双歧杆菌、大肠杆菌的数量表示为平均值 ± 标准误 × $10^3 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$, 乳酸菌为平均值 ± 标准误 × $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

3 讨论

乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌为猪消化道内固有的正常菌群。国内外许多研究表明, 乳酸菌和双歧杆菌对人和动物健康有积极的影响。本试验证明, 猪消化道内容物和粘膜中存在大量的乳酸菌, 并且数量显著高于双歧杆菌和大肠杆菌。目前对猪消化道中非致病性大肠杆菌在猪整个生命过程中的生态和行为方面的文献报道所见不多, 主要的原因是猪消化道中的大肠杆菌的区系组成非常复杂, 目前还缺乏一种花费时间短、准确性高的方法将大量的菌株鉴定到种以下的水平^[3]。

试验发现, 在生长猪的胃内容物和粘膜中均存在相当数量的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌, 特别是乳酸菌。猪和鸡消化道中的乳酸菌主要是乳杆菌^[10]。仔猪在出生的第1周胃的酸度可能主要是靠定植在消化道表面的产乳酸的细菌来维持的, 因为在此阶段仔猪分泌的盐酸很少。仔猪消化道寄居的乳杆菌能对胃中凝乳块形成和消化道表面酸性屏障的形成产生积极影响^[11]。但对其粘膜附着和作用机理目前研究不多。

试验结果表明, 小肠内容物和粘膜中也存在少量的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌。这可能与小肠特殊的生理环境有关。猪消化道各区段的消化生理环境存在着很大的差异, 特别是胃、小肠和后肠之间。猪的胃和小肠消化液的pH分别呈酸性和弱碱性环境, 且猪自身分泌的各种消化酶活性很高。在这种环境条件下, 胃和小肠内容物中依然存在一定数量的乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌。此现象可能与菌种有关, 即某些菌种能够适应特殊的生理环境, 并在肠道内发挥其生理作用。Tannock等^[12]报道定植在仔猪胃中的乳杆菌的菌株与直肠内的不同。

国内外对小肠微生物区系的研究报道不多。据报道^[13], 猪的空肠和回肠的正常微生物, 每克肠内容物(湿重)所含不同菌群的菌数对数值是: 空肠, 乳杆菌(7.3 ± 0.6)、双歧杆菌(7.2 ± 0.7); 回肠, 双歧杆菌(7.6 ± 0.8)、乳杆菌(7.4 ± 0.6)。普通鸡的小肠内, 细菌数量少, 而且种类有限。本试验结果与前人的研究结果一致。

Robinson等^[1]报道猪盲肠内容物中革兰氏阳性菌的优势菌为嗜酸乳杆菌(7.6%)、发酵乳杆菌(2.5%), 产生消化链球菌(3.0%)和产气真杆菌(2.5%)。未分离到双歧杆菌和大肠杆

菌。本试验发现盲肠和结肠是 3 类菌寄居数量较高的部位, 尤其是乳酸菌。

Russell^[14]通过对 4 头 20~ 25 周龄大白猪结肠内容物中分离出的 224 个菌落的鉴定发现, 乳杆菌为微生物区系中的优势菌之一, 占分离菌株的 20.8%。其中主要包括希莱曼氏乳杆菌 (*L. leichmannii*) 4.69%、德氏乳杆菌 (*L. delbreuckii*) 3.65%、植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 2.6%, 嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、短乳杆菌 (*L. brevis*) 和小乳杆菌 (*L. minutis*) 各占 2.08%; 双歧杆菌和大肠杆菌仅占 1.56%, 但对结肠粘膜中的微生物区系未作分离鉴定。本试验也发现结肠内容物和粘膜中均存在相当数量的乳酸菌, 并显著高于其他区段 ($P < 0.01$)。由于条件原因, 未对分离的菌株进行鉴定分类。Robinson 等^[15]在对 7~ 9 周龄的同一头猪的结肠内容物和粘膜中微生物区系的比较发现, 2 个部位的微生物区系组成明显不同, 结肠粘膜上皮附着的微生物主要是革兰氏阳性菌 (71% 以上), 其中链球菌 (*Streptococcus*) 占 54.5%、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 8.1%、发酵乳杆菌 (*L. fermentus*) 3.7%; 青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*) 1.5%, 而大肠杆菌 (*E. coli*) 不到 1%。但在猪发生腹泻时, 大肠杆菌和其他革兰氏阴性菌的数量明显增多, 微生物区系发生改变。

国内外学者对猪的粪便微生物区系进行了大量的研究。但由于试验条件和所用方法等因素不同, 文献报道的研究结果不一。据报道^[13], 猪粪便中的细菌总数 (对数值) 为 10.8 ± 0.4 , 优势菌为类杆菌 (10.3 ± 0.5)、乳杆菌 (9.9 ± 0.4)、消化球菌 (9.8 ± 0.3)、双歧杆菌 (9.0 ± 0.5)、肠杆菌 (8.1 ± 0.1)。本研究也证明乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌的数量间存在明显的差异。

4 结论

研究证明, 在生长猪的整个胃肠道的内容物中和粘膜上均寄居着乳酸菌、双歧杆菌和大肠杆菌, 且乳酸菌的数量在整个消化道内显著高于其他 2 种细菌。3 类菌在整个生长猪的消化道内容物中和粘膜上的数量分布均存在显著的差异。

参 考 文 献

- 1 Robinson IM, Allison M J, Bucklin J A. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 950~ 955
- 2 Mitsuoka T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 1984, 3: 11
- 3 Katouli M, Lund A, Wallgren P, et al. Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 778~ 783
- 4 Mann D E, Rogosa J C M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bact*, 1960, 23: 130~ 135
- 5 Alm L, Leijonmarck C E, Persson A K, et al. Survival of lactobacilli during digestion: an *in vitro* and *in vivo* study. In: Grubb R, Midtveit T, Norin E, eds. *Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. New York: Stockton Press, 1989, 293~ 297
- 6 Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J R, Ribbons E W, eds. *Methods in Microbiology*. NY: Academic Press, 1969, 3: 117~ 144
- 7 Bryant M P, Burkey L A. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J Dairy Sci*, 1953, 36: 205~ 217

- 8 高巍, 孟庆翔 生长育肥猪胃肠道正常厌氧菌群的数量和分区 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 88~ 93
- 9 SAS SAS User's Guide: Statistics (Version 6.12 ed.) SAS Inst. Inc., Cary, NC, 1996
- 10 Fuller R, Barrow P A, Brooker B E Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs Appl Environ Microbiol, 1978, 35: 582~ 591
- 11 Pedersen K, Tannock G W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 279~ 283
- 12 Tannock G W, Fuller R, Pedersen K Lactobacillus succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 1310~ 1316
- 13 康白主编 微生物学 大连: 大连出版社, 1985, 260~ 263
- 14 Russell E G Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs Appl Environ Microbiol, 1979, 37: 187~ 193
- 15 Robinson IM, Whipp S C, Bucklin J A, et al Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs Appl Environ Microbiol, 1984, 48: 964~ 969

www.cnki.net