

# 生长育肥猪胃肠道正常厌氧菌群的数量和分区

高 巍 孟庆翔

(中国农业大学动物科技学院)

**摘 要** 采用厌氧微生物学方法,对 2 头育肥猪的胃、小肠、盲肠、结肠和直肠的固相、液相和粘膜中的总厌氧菌、淀粉分解菌、纤维分解菌和蛋白分解菌的数量分布和比例进行了研究。结果表明,上述总厌氧菌和 3 种功能菌群的数量在胃和小肠区段固相内容物中占绝对优势,而在盲肠、结肠和直肠内容物中以液相菌群占绝对优势。在胃和小肠区段,固相、液相内容物中 3 种功能菌群的数量间无明显差异,但在盲肠、结肠和直肠段,固、液相内容物中淀粉分解菌和蛋白分解菌为优势菌群。在各区段胃肠道粘膜中,胃和小肠的 3 种菌群的数量相对较低。盲肠粘膜中主要菌群数量分布为蛋白分解菌> 淀粉分解菌> 纤维分解菌( $P < 0.01$ );而结肠和直肠粘膜中以淀粉分解菌占绝对优势。

**关键词** 胃肠道微生物; 微生物分区; 育肥猪

**分类号** S816.15

## Numeration of Normal Bacterial Populations in Gastrointestinal Tract of Finishing Swine

Gao Wei Meng Qingxiang

(College of Animal Sciences and Technology, CAU)

**Abstract** A study was conducted to determine the number of total anaerobic, amylolytic, cellulolytic and proteolytic bacteria associated with solid, liquid and mucous phases of various segments (gastric, small-intestine, cecum, colon and rectum) and the ratio of the bacteria distributed in the solid and liquid phases along the length of the swine gastrointestinal tract. The bacterial population was predominantly present in solid phases of gastric and small intestines, whereas the population present in liquid phases of the hindgut represented a principal bacterial group. Among the three major functional bacterial groups, the number of the bacteria in the solid and liquid phase of gastric and small intestines was similar; however, amylolytic and proteolytic bacteria in the solid and liquid phases of the hindgut were the predominant microbial groups. In mucus layers of the gastric and small intestines, the bacterial populations were fairly low. Distribution of the three bacterial groups in the cecum mucus was: proteolytic > amylolytic > cellulolytic ( $P < 0.01$ ). The amylolytic bacteria in the mucus layers of colon and rectum were the principal groups. Our results suggested that bacteria distributed along the various segments of swine gastrointestinal tract and the distribution was characterized with the compartment in solid and liquid phases.

**Key words** normal gastrointestinal bacteria; microbial compartment; finishing pig

收稿日期: 2000-03-21

国家自然科学基金资助项目(39870589)

高巍, 北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

动物胃肠道正常微生物区系在动物营养、健康、防病、免疫等方面发挥着重要作用。猪胃肠道中生存着大量的种类繁多的微生物, 大肠每克内容物中微生物的数量可超过  $10^{10}$  数量级, 且绝大多数为严格厌氧菌<sup>[1]</sup>。猪胃肠道微生物区系组成和功能的研究为研究微生物发酵、猪下痢的病原菌、抗生素的促生长机制、抗生素替代物和活菌制剂的开发等提供理论依据和试验根据。但目前猪的消化道微生物区系组成和生理功能方面的研究较少。

在瘤胃微生物研究中, Cheng 和 Costerton<sup>[2]</sup>按照栖居于不同“生态位点”的特性, 将瘤胃微生物划分为 3 大群落, 即液相(瘤胃内液体中的细菌), 固相(以食糜颗粒或深入食物颗粒内部为栖居点的微生物), 粘膜相(粘附于瘤胃上皮细胞表面的微生物)。此 3 类菌群在稳定瘤胃内环境和饲料消化分解过程中发挥重要作用。我们将此概念移植到猪的消化道微生物的研究中, 旨在了解猪消化道不同区段(胃, 小肠, 盲肠, 结肠和直肠)各相中的总厌氧菌及 3 种主要菌群(纤维分解菌、淀粉分解菌和蛋白分解菌)的数量和分布, 为进一步深入研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物及采样

**1.1.1 动物** 本试验所用的育肥猪(体重 90~ 100 kg)为长白×大白杂交猪。每日饲喂粗蛋白(CP)14% 消化能(DE)12.6 MJ·kg<sup>-1</sup>玉米-豆粕型日粮 2 次, 日粮中不添加抗生素。采食量(以干物质为基础)为体重的 2.5%。随机挑选 2 头健康猪屠宰。剖开腹腔后迅速分离胃、小肠(空肠段)、盲肠、大结肠(肠襻中部)和直肠。小肠、大结肠和直肠段各取 25 cm 左右, 保证有 5~ 10 g 食糜。肠管两端用线绳结扎以保持厌氧环境, 自结扎外端剪断, 所取各段分装封口塑料袋中并排气封口, 立即放入-86℃超低温冰箱(Foma Scientific, Model 717)冷冻保存。所有样品冷冻保存的时间不超过 30 d。

**1.1.2 采样** 将冷冻的肠段用自来水冲淋解冻。测定各区段食糜的干物质含量和 pH(数字 pH 计, Orion Research model SA 230)。在超净台中用 2 层无菌纱布过滤食糜, 滤液(液相)置于加玻璃珠的三角瓶中。称取一定量过滤后的食糜(固相)于三角瓶中, 用 PBS 作  $10^{-1}$  稀释。结肠和直肠段的内容物较粘稠, 需称重后加入一定量的 PBS 稀释后再过滤。同时测定过滤后食糜的干物质含量。剖开肠管, 用 PBS 冲洗肠管内壁至无肉眼可见的食糜颗粒为止。用载玻片刮取一定量的肠粘膜于三角瓶中, 用 PBS 作  $10^{-1}$  稀释, 测量刮取粘膜的肠内壁面积。三角瓶经振荡并通入 CO<sub>2</sub> 气体 20 min 后, 分别用 1 mL 卡介苗注射器取 1 mL 液体注入盛有 9 mL 厌氧稀释液的具塞试管中, 并逐级稀释至  $10^{-10}$ 。各管加样后用微型旋涡混合仪振荡 30 次。

### 1.2 接种与培养

**1.2.1 厌氧稀释液及培养基的制作** 厌氧稀释液的配方及制作按 Bryant 和 Burkey<sup>[3]</sup>方法。总厌氧菌、纤维分解菌、淀粉分解菌和蛋白分解菌培养基的制作及配方见 Hungate<sup>[4]</sup>。刃天青作为培养基的厌氧指示剂。纤维分解菌培养基中所用的滤纸粉为滤纸(No. 2, 新华造纸厂)烘干剪碎并用球磨机(SO-B 球磨机, 海宁新华机械厂, 36 r·min<sup>-1</sup>)球磨 72 h。厌氧稀释管和培养基 121℃ 15 min 灭菌。在厌氧培养箱(Foma Scientific, Model 1025, V<sub>N<sub>2</sub></sub> V<sub>CO<sub>2</sub></sub> V<sub>H<sub>2</sub></sub> = 75:15:10)中倒平皿, 每个平皿倒培养基约 15 mL。所用培养皿为干热灭菌(180℃, 3~ 4 h)。

**1.2.2 接种与培养** 在厌氧培养箱中进行接种及培养。接种梯度为  $10^{-3}$ ~  $10^{-10}$ 。一个平皿滴种 2 个稀释度。每个稀释度重复 5 滴, 每滴 25 μL。各相依次由高稀释度到低稀释度滴种。培

养箱中 38 培养 5 d, 纤维分解菌培养 7 d。

1.2.3 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。

### 1.3 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<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 猪胃肠道内容物干物质含量及 pH (表 1)

表 1 猪胃肠道内容物干物质及 pH

猪胃肠道区段	干物质 $w/\%$	pH
胃	25.35 $\pm$ 0.15	4.48
小肠	11.32 $\pm$ 0.27	6.18 $\pm$ 0.11
盲肠	14.89 $\pm$ 1.27	6.99 $\pm$ 0.03
结肠	25.59 $\pm$ 0.22	7.79 $\pm$ 0.03
直肠	26.80 $\pm$ 0.68	7.98 $\pm$ 0.02

表中所列数值为平均值  $\pm$  标准误;

为第一头猪的结果, 第二头猪的胃出现局部溃疡灶, 故未测定。

### 2.2 猪胃肠道不同区段固相主要菌群的数量变化 (表 2)

表 2 猪胃肠道不同区段固相主要菌群的数量

$10^7$  cfu  $\cdot$  g<sup>-1</sup> (DW)

菌 群	胃	小肠	盲肠	结肠	直肠
总厌氧菌	3.72 $\pm$ 0.28 a	28.70 $\pm$ 8.15 a	150.20 $\pm$ 48.87 a	18.18 $\pm$ 3.93 a	71.8 $\pm$ 10.00 a
淀粉分解菌	4.39 $\pm$ 0.41 a	4.89 $\pm$ 0.74 b	192.64 $\pm$ 36.54 a	5.43 (r) $\pm$ 0.56 B93.9 $\pm$ 44.50 b	
纤维分解菌	6.19 $\pm$ 0.28 b	6.10 $\pm$ 0.59 b	12.98 $\pm$ 0.79 b	0.56 $\pm$ 0.081 c	159.0 $\pm$ 17.30 c
蛋白分解菌	4.45 $\pm$ 0.69 a	5.06 $\pm$ 0.47 b	35.83 $\pm$ 8.77 b	28.12 $\pm$ 2.55 d	318.4 $\pm$ 17.20 d

, 同表 1;

结肠内容物固相淀粉分解菌的数量为 (5.43  $\times 10^{10}$  cfu  $\cdot$  g<sup>-1</sup> (DW));

表中同列数值有不同字母的为差异显著 ( $P < 0.01$ )。

猪胃肠道不同区段内容物固相的总厌氧菌及 3 种主要菌群的数量分布是不同的。总厌氧菌在盲肠内容物固相最高, 达 (150.20  $\times 10^7$ ) cfu  $\cdot$  g<sup>-1</sup> (DW), 依次为直肠、结肠、胃、小肠。胃内容物固相中存在一定数量的细菌, 且纤维分解菌的数量显著高于其他 2 种菌群 ( $P < 0.01$ )。小肠内容物固相中虽然存在少量细菌, 但 3 种主要菌群间差异不显著 ( $P > 0.10$ )。淀粉分解菌是盲肠内容物固相中的优势菌群, 其数量明显高于纤维分解菌和蛋白分解菌 ( $P < 0.01$ )。纤维和蛋白分解菌间差异不显著。结肠和直肠内容物固相中 3 种主要菌群的数量分布为: 淀粉分解菌 > 蛋白分解菌 > 纤维分解菌 ( $P < 0.01$ )。

2.3 猪胃肠道不同区段液相主要菌群的数量分布(表 3)

表 3 猪胃肠道不同区段液相主要菌群的数量

cfu·mL<sup>-1</sup>

菌 群	胃 (×10 <sup>3</sup> )	小肠(×10 <sup>4</sup> )	盲肠(×10 <sup>7</sup> )	结肠(×10 <sup>9</sup> )	直肠(×10 <sup>10</sup> )
总厌氧菌	12 40±7. 12 a	9 84±5. 11 a	2 69±0. 91 a	6 83±2. 16 a	19 32±4. 32 a
淀粉分解菌	4 88±0. 59 b	1. 20±0. 85 b	612 0±94. 67 b	241 0±38. 60 b	15 22±3. 93 a
纤维分解菌	37. 44±20. 90 c	2 00±0. 89 b	7. 52±1. 91 a	14 54(r)±5. 10 c	3 25±0. 38 b
蛋白分解菌	48 80±38. 54 d	0 80±0. 53 b	6 00±1. 17 a	955 84±355. 89 d	12 40±4. 00 ab

， ， 同表 2;

结肠内容物液相纤维分解菌的数量为(14 54×10<sup>9</sup>) cfu·mL<sup>-1</sup>。

总厌氧菌数在直肠液相中的数量最高, 达(19. 32×10<sup>10</sup>) cfu·mL<sup>-1</sup>, 依次为结肠、盲肠、小肠和胃。3 种菌群在胃液中的数量分布为: 蛋白分解菌> 淀粉分解菌> 纤维分解菌(P< 0. 01)。小肠液中 3 种菌群的数量很低且差异不显著。盲肠液相菌的数量分布与固相相似, 淀粉分解菌的数量最多。结肠内容物液相菌群的数量分布为: 蛋白分解菌> 淀粉分解菌> 纤维分解菌。而直肠内容物液相中淀粉分解菌和蛋白分解菌的数量明显高于纤维分解菌(P< 0. 01)。

2.4 猪胃肠道不同区段主要菌群在固相、液相中的分布比例(图 1)

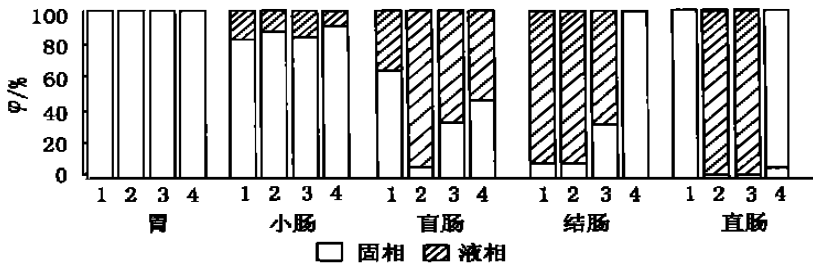


图 1 猪胃肠道不同区段主要菌群在固相、液相中的分布比例

1 总厌氧菌, 2 淀粉分解菌, 3 纤维分解菌, 4 蛋白分解菌

总厌氧菌及 3 种主要菌群分别在固相、液相中的分布比例关系有较一致的规律: 胃和小肠中固相菌所占的比例占绝对优势, 说明胃和小肠中固相菌群起主要作用。盲肠、结肠和直肠以液相菌的比例占绝对优势。

2.5 猪胃肠道不同区段主要菌群在粘膜中的分布数量(表 4)

表 4 猪胃肠道不同区段主要菌群在粘膜中的分布数量

cfu·cm<sup>-2</sup>

菌群	胃 (×10 <sup>5</sup> )	小肠(×10 <sup>3</sup> )	盲肠(×10 <sup>3</sup> )	结肠(×10 <sup>3</sup> )	直肠(×10 <sup>5</sup> )
总厌氧菌	4 36±0. 79 ab	2 55±0. 54 a	4 07±0. 52 a	6 31±0. 80 b	6 03±1. 66 a
淀粉分解菌	4 16±0. 27 ab	4 20±0. 82 ab	260 38±98. 45 b	2 07 c±0. 21 a	481 47±189. 7 b
纤维分解菌	5 82±0. 62 a	1. 48±0. 66 a	10 48±1. 50 c	3 26±0. 54 b	1 85±0. 20 a
蛋白分解菌	2 89±1. 25 b	6 20±1. 70 b	2720 11±933. 90 d	134 3±39. 80 c	1 50±0. 39 a

， ， 同表 2;

结肠粘膜的淀粉分解菌分布数量为(2 07×10<sup>9</sup>) cfu·cm<sup>-2</sup>。

粘液中总厌氧菌的数量分布为: 直肠> 胃> 结肠> 盲肠> 小肠。胃粘液中淀粉分解菌和纤维分解菌的数量显著高于蛋白分解菌( $P < 0.01$ )。小肠粘膜3种主要菌群数量分布为: 蛋白分解菌> 淀粉分解菌> 纤维分解菌。盲肠粘膜上分布着较高数量的蛋白分解菌和淀粉分解菌; 结肠和直肠粘膜微生物区系中蛋白分解菌和淀粉分解菌的数量分别高于其它2种菌群( $P < 0.01$ )。至于粘膜菌群在猪胃肠道内饲料消化中所起的作用、和宿主的关系及与固相、液相菌群有无协同作用等还需进一步研究。

### 3 讨论

有关生育肥猪胃肠道微生物方面的研究较少。一般认为, 单胃动物胃肠道中的微生物主要存在于消化道后段。本试验结果也表明, 生育肥猪胃肠道后段, 如盲肠、结肠和直肠是微生物聚集的主要区段。尽管胃和小肠内酸度较高, 但仍有大量微生物活动, 特别是在固相内容物内, 它们可能也直接参与动物对养料如碳水化合物、蛋白质等的消化过程。

Cheng 与 Costerton<sup>[2]</sup>发现反刍动物瘤胃微生物存在于固相、液相和粘液中, 且存在于不同“相”中的微生物具有不同的生物学功能。在本研究中发现, 猪胃肠道中的微生物同样具有分区性(compartment), 且不同微生物在不同区段和不同“相”中的分布比例不同。胃内容物固相中以纤维分解菌为优势菌群, 液相中蛋白分解菌的数量显著高于纤维分解菌, 而粘液中以纤维分解菌和蛋白分解菌占优势。胃内容物中高比例的固相菌群数量, 可能是与微生物为了躲避胃液的酸性环境有关。淀粉分解菌为猪后肠微生物区系的优势菌群, 其次是蛋白分解菌群, 此区系特征可能和试验猪的日粮有关。由于试验猪饲喂的是常规玉米-豆粕型日粮, 日粮中含有大量的淀粉, 在胃和小肠中未被消化或消化不完全的淀粉在猪后肠由细菌发酵产生挥发性脂肪酸(VFA), 为猪提供部分能量需要。猪后肠中存在相当数量的纤维分解菌, 其数量呈现从盲肠到直肠呈逐渐增加的趋势。本试验还发现, 盲肠内容物固相、液相和粘液中存在大量纤维分解菌, 表明盲肠是日粮纤维发酵生成挥发性脂肪酸的主要场所。Varel<sup>[6]</sup>报道, 猪后肠微生物发酵产生的VFA可为宿主提供能量需要的5%~30%。对母猪来说可能更多, 因为在给母猪饲喂96%甚至100%苜蓿草粉的情况下仍能维持正常繁殖性能。Yen等<sup>[7]</sup>试验证实生长猪后肠发酵产生的VFA可为其提供能量需要的23.8%。虽然直肠中纤维分解菌的数量也较高, 但由于肠道内容物在该段停留的时间短, 推测纤维分解菌的纤维降解作用对宿主的意义不大。目前关于猪胃肠道微生物区系中淀粉分解菌和蛋白分解菌的数量分布及生理功能的研究的文献报道很少。本研究发现, 饲喂玉米-豆粕型日粮的育肥猪胃肠道内容物固相、液相及粘液中均分布着数量不等的淀粉分解菌和蛋白分解菌, 并且是3种生理菌群的优势菌群, 推测此微生物可能参与动物对饲料淀粉和蛋白质等养分的消化与吸收等重要生理过程。

Salanitro等<sup>[8]</sup>对2头猪的盲肠内容物中和盲肠粘膜菌群的数量进行了比较。结果发现, 盲肠内容物和粘膜总厌氧菌的数量平均为 $(203 \times 10^9) \cdot g^{-1}(DW)$ 和 $(30.5 \times 10^6) \cdot cm^{-2}$ , 并且, 盲肠粘膜菌群中存在极少量的好氧菌。本试验与其结果相似, 盲肠内容物固相、粘膜的总厌氧菌数平均分别为 $(1.50 \times 10^9) \cdot g^{-1}(DW)$ 和 $(4.07 \times 10^3) \cdot cm^{-2}$ 。

### 4 结论

本试验证明, 育肥猪胃肠道正常厌氧菌群在不同区段的数量分布和比例是不相同的。在猪

后肠段, 固相、液相内容物和粘膜中均寄居着大量的细菌。与反刍动物瘤胃中细菌分区现象相似, 猪胃肠道细菌也存在明显的分区现象。

### 参 考 文 献

- 1 Jensen B B, Jorgensen H. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 1897~ 1904
- 2 Cheng K J, Costerton J W. Adherent rumen bacteria: Their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells In: Ruckebusch Y, Thivend P, eds *Digestion Physiology and Metabolism in Ruminants* AVIPublishing Co, Westport, CT, 1980, 227~ 250
- 3 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
- 4 Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes In: Norris J R, Ribbons E W, eds *Methods in Microbiology*. N Y: Academic Press, 1969, 3: 117~ 144
- 5 SAS SAS User's Guide: Statistics (Version 6.12 ed.) SAS Inst Inc, Cary, NC, 1996
- 6 Varel H. Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine. *J Anim Sci*, 1987, 65: 488~ 496
- 7 Yen J T. Potential contribution of absorbed volatile fatty acid to whole-animal energy requirement in conscious swine. *J Anim Sci*, 1991, 69: 2001~ 2012
- 8 Salanitro J P, Blake I G, Muirhead P A. Isolation and identification of bacteria from adult swine. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33: 79~ 84