

鸡空肠和盲肠微生物区系的研究

何维明¹ 于致茂² 严宝英²

S858.310.6

(1 陕西省畜牧兽医研究所, 2 陕西省畜牧兽医总站, 咸阳 712039)

摘要 应用20日龄白来航小母鸡的肠道内容物, 研究消化道部分区段微生物区系, 分离鉴定出需氧菌和厌氧菌, 并进行了毒力试验。结果表明, 每克肠内容物含细菌的对数值(log n/g)为: 空肠中消化球菌 9.6 ± 0.2 、双歧杆菌 9.4 ± 0.5 、拟杆菌 10.6 ± 0.6 、葡萄球菌 6.6 ± 0.6 、乳杆菌 9.3 、肠杆菌 6.8 ± 0.4 ; 盲肠中葡萄球菌 6.7 ± 0.6 、消化球菌 9.8 ± 0.3 、双歧杆菌 9.2 ± 0.8 、拟杆菌 10.2 ± 0.2 、棒状杆菌 8.7 ± 0.4 、肠杆菌 6.8 ± 0.3 、链球菌 7.2 ± 0.2 、乳杆菌 9.6 ± 0.4 、酵母菌 4.2 ± 1.4 。

关键词 鸡, 空肠, 盲肠, 微生物区系

中图分类号 S858.310.261

国外研究^[1]证明, 应用家禽肠道内非病原性微生物可保护家禽不受病原菌(如沙门氏菌)的侵害。该研究为防治鸡白痢开创了广阔的前景。为了研制生物“竞争素”防治鸡白痢, 自1987年以来, 作者研究了健康鸡消化道微生物区系, 分离鉴定出多株无致病力的厌氧微生物, 如双歧杆菌、消化球菌、乳酸杆菌等。这些厌氧微生物对动物机体具有免疫、拮抗及营养等许多有益的生理功能, 对研究动物机体生态防治、调整菌群失调具有重要意义和实用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 培养物来源及要求 20日龄白来航母鸡, 由咸阳市渭城区种鸡场提供, 该鸡近期未曾使用过抗菌素史, 饲料中或饮水内也未添加抗菌素或磺胺类药物。应用鸡白痢沙门氏菌多价抗原, 连续2次进行凝集试验, 间隔10d, 均为阴性。

1.1.2 培养菌与培养基 除基础培养基如血琼脂培养基、马丁肉汤和生化试验用培养基外, 大肠杆菌用伊红美兰琼脂培养基, 乳酸杆菌用乳清琼脂培养基, 酵母菌用沙堡罗氏培养基, 拟杆菌用拟杆菌培养基, 双歧杆菌用双歧杆菌培养基。

1.1.3 实验动物 小白鼠、豚鼠及家兔(均为5月龄), 由陕西省卫生防疫站实验动物舍提供。5日龄雏鸡, 由陕西省祖代鸡场提供。

1.1.4 大肠杆菌血清型 O群血清(每组含10种因子血清)及单因子血清, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.1.5 厌氧培养装置 100 mL容积的干燥器内加入1.0 mL的150 g/L NaOH溶液及

收稿日期 1997-06-02

课题来源 陕西省科委“八五”攻关项目

作者简介 何维明, 男, 1944年生, 副研究员

1 g 焦性没食子酸,同时点燃蜡烛与氧生成二氧化碳,形成厌氧环境。

1.2 方法

试验鸡在应用前,均用鸡白痢沙门氏菌凝集抗原,进行血清学试验,阴性者方可使用。按常规法进行解剖,详细检查主要内脏器官及消化道内容物无异常者,然后无菌操作摘除空肠和盲肠待用。

1.2.1 肠内容物的稀释 无菌操作,将1 g 鸡的空肠和盲肠内容物,分别置无菌的试管内,加入9 mL 生理盐水,充分摇振30 min 至均匀为止,第1管稀释液为 10^{-1} 。另取9支试管,各加入4.5 mL 生理盐水,然后进行递增稀释至第10管为 10^{-10} 。

1.2.2 肠内容物中微生物的分离 用定量滴管吸取稀释液,从高稀释度开始吸液,分别向各平皿培养基表面滴种,每个平皿(培养1种细菌)滴种3个稀释度,每个稀释度3滴。置37℃温箱,进行需氧和厌氧培养24~48 h。然后:①需氧和厌氧培养物分别作纯培养,获得纯细菌培养物;②采用纯培养物抹片,革兰氏染色,镜检。详细观察细菌的染色特性、形态学及培养特性,并逐一接种生化反应发酵管,进行生化反应鉴定;③初步鉴定的菌株,应用兰氏(Lancefield)^[2]血清学分类法和一般细菌鉴定法^[3],进一步鉴定细菌类型和菌型,以求定论。

1.2.3 含菌数 需氧或厌氧培养后计算菌落,求出每个稀释度菌落数的平均值,作为该稀释度的菌数。计算公式:每克肠内容物含菌数=菌落数×滴管滴数×稀释度。以对数值表示之。

2 结果

2.1 空肠和盲肠内容物分离鉴定细菌

从20日龄小鸡空肠内容物中分离鉴定出2株需氧菌:葡萄球菌、粪链球菌(*S. faecium*,即肠球菌);5株厌氧菌:双歧杆菌(*B. bifidum*)、消化球菌、拟杆菌、小梭菌即腐败梭菌(*C. septicum*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)。

从盲肠内容物中分离鉴定出5株需氧菌:葡萄球菌、大肠埃希氏杆菌(*E. coli*) O₇型、驹棒状杆菌(*C. equi*)、酵母菌、粪链球菌;6株厌氧菌:双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、消化球菌、拟杆菌、小梭菌(即腐败梭菌)、嗜热链球菌(*S. thermophilus*)。

2.2 分离细菌的鉴定结果

分离细菌的形态学、染色特性、培养特征及生化反应等检验结果,详见附表。

2.3 分离鉴定细菌的毒性试验结果

毒性试验按口服(0.3~0.5 mL)、腹腔(0.2 mL)、肌肉或皮下注射(0.3~1.0 mL)等途径感染实验动物(小白鼠、豚鼠和家兔)及雏鸡,其结果除葡萄球菌、*E. coli*对小白鼠、雏鸡致病外,其余分离鉴定细菌对实验动物均无致病力。

附表 分离细菌的形态学、染色特性、培养特征及生化反应

染色特性	形态及排列	荚膜/芽胞	运动性	培养特性			生化反应	鉴定结果	血清学鉴定
				马丁肉汤	血琼脂	特殊培养基			
革兰氏阴性	中等大小杆状, 成对	无/无	—	均匀混浊	不溶血, 菌落呈灰白色, 不透明	在伊红美兰培养基上呈红色中心	葡萄糖 ⁺ , 乳糖 ⁻ , 甘露醇 ⁻ , 硝酸盐还原 ⁺ , 脲基质 ⁺ , 甲基红 ⁻ , V-P ⁻ , H ₂ S ⁻ , 尿素酶 ⁻	埃希氏大肠杆菌	O ₇ 型
革兰氏阳性	圆形, 单个或成对, 少数短链	无/无	—	混浊	溶血, 菌落呈灰白色, 不透明	未做	麦芽糖 ⁺ , 乳糖 ⁻ , 蔗糖 ⁻ , 甘露糖 ⁺ , 棉实糖 ⁺ , 木糖 ⁻ , 明胶液化 ⁻ , M ⁺ , R ⁻	葡萄球菌	
革兰氏阳性	单个, 成对, 呈短链状	无/无	—	上清液, 管底有沉淀, 摇振呈片状浮起	不溶血; 菌落呈灰白色, 半透明	未做	阿拉伯糖 ⁺ , 麦芽糖 ⁺ , 乳糖 ⁻ , 蔗糖 ⁺ , 甘露糖 ⁺ , 山梨醇 ⁺ , 水杨素 ⁺ , 蔗糖 ⁻ , 密二糖 ⁻ , 菊糖 ⁻	肠球菌	粪链球菌 (<i>S. faecium</i>)
革兰氏阳性	短杆状, 两端圆, 也有球形	无/无	—	均匀混浊	大菌落, 粘稠, 初为淡褐色, 后为红色	未做	葡萄糖 ⁻ , 麦芽糖 ⁻ , 乳糖 ⁻ , 蔗糖 ⁻ , 甘露糖 ⁻ , 硝酸盐还原 ⁻ , 明胶液化 ⁻ , 石蕊牛乳 ⁻	棒状杆菌	驹棒状杆菌 (<i>C. equi</i>)
革兰氏阳性	大杆状, 两端圆, 单个或成节	无/有	—	强烈混浊	乙型溶血, 菌落较大, 灰白色, 不透明	未做	葡萄糖 ⁻ , 麦芽糖 ⁻ ; 乳糖 ⁻ , 水杨素 ⁻ , H ₂ S ⁺ , 明胶液化 ⁺ , 硝酸盐还原 ⁻ , 脲基质 ⁻ , 石蕊牛乳 ⁺	小梭菌	腐败梭菌 (<i>C. septicum</i>)
—	椭圆形, 单个或成对排列	无/无	—	一致混浊, 有时形成很薄的菌膜	不溶血, 菌落呈灰白色, 不透明	麦芽汁琼脂斜面: 菌落呈乳白色, 表面光滑, 有光泽, 边缘整齐	葡萄糖 ⁻ , 乳糖 ⁺ , 麦芽糖 ⁻ , 木糖 ⁺ , 棉子糖 ⁻ , 阿拉伯糖 ⁻ , 杨甘 ⁺ , 密二糖 ⁻ , 纤维二糖 ⁻ , 淀粉 ⁻ , 硝酸盐还原 ⁻	酵母菌	
革兰氏阳性	多形态, 杆状, 有的呈 Y 分枝状	无/无	—	一致混浊	不溶血, 菌落呈灰白色, 不透明	菌落较小, 透明, 边缘整齐	葡萄糖 ⁺ , 乳糖 ⁺ , 果糖 ⁻ , 麦芽糖 ⁺ , 蔗糖 ⁺ , 密二糖 ⁺ , 阿拉伯糖 ⁻ , 纤维二糖 ⁻ , 棉实糖 ⁻ , 木糖 ⁻ , 甘露糖 ⁻ , 菊糖 ⁻ , 山梨醇 ⁻ , 水杨素 ⁻ , 过氧化氢酶 ⁻ , 石蕊牛乳 ⁻ , H ₂ S ⁻ , 甲基红 ⁺ , 硝酸盐还原 ⁺	双歧杆菌	两歧双歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)
革兰氏阳性	球状, 单个或成对, 成链状	无/无	—	强烈混浊, 有菌膜	不溶血, 菌落较大, 呈灰白色	菌落呈露滴状, 不透明, 稍突起	蔗糖 ⁺ , 麦芽糖 ⁻ , 甘露糖 ⁺ , 水杨素 ⁺ , 乳糖 ⁻ , H ₂ S ⁻ , 过氧化氢酶 ⁻	消化球菌	
革兰氏阴性	杆状, 两端圆形, 成对	无/无	—	均等混浊	不溶血, 菌落呈灰白色, 不透明, 内部呈同心环状	菌落较小, 不透明, 稍隆起	果糖 ⁻ , 麦芽糖 ⁺ , 甘露糖 ⁺ , 蔗糖 ⁺ , 木糖 ⁺ , 葡萄糖 ⁻ , 棉实糖 ⁻ , 水杨素 ⁻ , 乳糖 ⁻ , 过氧化氢酶 ⁻ , 甲基红 ⁻ , 硝酸盐还原 ⁻	拟杆菌	
革兰氏阳性	中等杆状, 单个或成对, 呈短链状	无/无	—	均匀混浊	不溶血, 灰白色, 圆形, 边缘整齐	菌落呈露滴状, 边缘整齐	乳糖 ⁺ , 蔗糖 ⁺ , 麦芽糖 ⁻ , 阿拉伯糖 ⁻ , 菊糖 ⁻ , 蔗糖 ⁻ , 甘露糖 ⁻ , 山梨醇 ⁻ , 水杨素 ⁻ , 石蕊牛乳 ⁺ , 硝酸盐还原 ⁻ , 明胶液化 ⁻	乳杆菌	嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i>)
革兰氏阳性	球状或杆状, 单个或成对, 呈短链状	无/无	—	均匀混浊	不溶血, 菌落呈灰白色, 不透明	未做	乳糖 ⁺ , 蔗糖 ⁺ , 密二糖 ⁻ , 阿拉伯糖 ⁻ , 麦芽糖 ⁻ , 蔗糖 ⁻ , 甘露糖 ⁻ , 山梨醇 ⁻ , 水杨素 ⁻ , 明胶液化 ⁻ , 淀粉水解 ⁻ , 石蕊牛乳 ⁻	乳链球菌	嗜热乳链球菌 (<i>S. thermophilus</i>)

注: ⊕产酸产气; +产酸或阳性, -不产酸或阴性。

2.4 分离鉴定细菌在空肠和盲肠内容物中的含菌数

分离鉴定细菌的对数值($\bar{x} \pm s$):每克空肠内容物为:消化球菌 9.6 ± 0.2 、双歧杆菌 9.4 ± 0.5 、拟杆菌 10.6 ± 0.6 、葡萄球菌 6.6 ± 0.6 、乳杆菌 9.3 、肠杆菌 6.8 ± 0.4 ;每克盲肠内容物为:葡萄球菌 6.7 ± 0.6 、消化球菌 9.8 ± 0.3 、双歧杆菌 9.2 ± 0.8 、拟杆菌 10.2 ± 0.2 、棒状杆菌 8.7 ± 0.4 、肠杆菌 6.8 ± 0.3 、链球菌 7.2 ± 0.2 、乳杆菌 9.6 ± 0.4 、酵母菌 4.2 ± 1.4 。

3 讨论

研究消化道部分区段微生物采用健康鸡,在饲养管理中,尽量控制鸡的主要病害的侵袭。在应用前1周内,在饲料和饮水中不能添加抗菌药物;解剖检查,内脏主要器官及消化道内容物均无异常现象,基本符合本实验要求。

盲肠内容物 pH 为 5.1~7.4,乃是微生物发育的生态环境。盲肠内容物中,74%的氮属于溶于水的部分,其中 64%属于蛋白质。在溶于水中的非蛋白氮中,氨基酸占 47%,肽氮占 8.5%。这证明盲肠内容物具有较高的营养价值,在代谢过程中具有重大意义。研究盲肠内容物中微生物的正常肠菌群,对防治肠道感染疾病具有很高的实用价值。

有资料证明^[4],在盲肠内容物中,有机酸的含量可达 27.5%,挥发性有机酸(脂肪酸)占 56.0%,乙酸占有有机酸的 25.0%,丁酸占 12.0%。在不挥发性有机酸中,琥珀酸占 4.5%,乳酸浓度为 1%。这表明盲肠中存在着大量的乳酸杆菌。

双歧杆菌和乳酸杆菌,在维持宿主健康和肠内功能方面,具有合成为宿主利用的蛋白质、维生素等,帮助食物的消化和吸收,阻止外袭菌的繁殖及刺激免疫功能等作用^[5]。因此应尽可能通过多种途径增加体内上述诸菌的含量,以利人畜健康。

4 小结

应用现代微生物学技术,研究健康鸡消化道部分区段微生物区系,分离鉴定出 *E. coli*、葡萄球菌、消化球菌、双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌、酵母菌等;除 *E. coli*、葡萄球菌外,对雏鸡均无致病性。并研究了消化道内容物中含细菌的对数值($\log n/g \cdot$ 内容物)。为研究防治雏鸡疫病的“竞争素”奠定了基础。

参考文献

- 1 Lyons T P. Probiotics, an alternative to antibiotics. *Pig News and Information*, 1987, 8(2): 157~164
- 2 汪诚天,叶年编著. 兽医实验检验手册. 上海:上海科学技术出版社, 1984: 165~167
- 3 中国科学院微生物研究所编. 一般细菌常鉴定方法. 北京:科学出版社, 1978
- 4 Coulu J. Digestion of gastrointestinal tract. *Chnicktura*, 1973, 10(9): 4~5
- 5 康白,魏曦. 菌群失调与菌群调整疗法. *中华医学杂志*, 1989, 4: 249~252

Microflora in the Jejunum and Caecum of Chicken

He Weiming¹ Yu Zhimao¹ Yan Baoying²

(1 Shuanxi Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Xianyang 712039)

(2 Shuanxi General Station of Animal Science and Veterinary Medicine, Xianyang 712039)

Abstract The microfloras in some sections of digestive tract were studied with the intestine contents of the 20-day-old white leghorn hens. The aerobes-staphylococci, *E. coli*, *Corynebacterium*, Yeast and the anaerobes-mycobacterium, Lactic acidbacterium, Digestive coccus, *Bacteroides*, *Fusiformis fragilis*, *S. Lactis* were isolated and identified. The toxicities of the above bacteria were tested and the logarithmic values of the bacteria per gram content (Log n/g) of the intestines of the hens were determined. The results were digestive coccus 9.6 ± 0.2 , mycobacterium 9.4 ± 0.5 , bacteroides 10.6 ± 0.6 , staphylococci 6.6 ± 0.6 , Lactic acid bacterium 9.3, *E. coli* 6.8 ± 0.4 in the jejunum and staphylococci 6.7 ± 0.6 , Digestive coccus 9.8 ± 0.3 , mycobacterium 9.2 ± 0.8 , bacteroides 10.2 ± 0.2 , corynebacterium 8.7 ± 0.4 , *E. coli* 6.8 ± 0.3 , *S. Lactis* 7.2 ± 0.2 , Lactic acid bacterium 9.6 ± 0.4 , yeast 4.2 ± 1.4 in the caecum, respectively.

Key words chicken, jejunum, caecum, microflora