

鲤鱼肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响

汤伏生 朱晓燕 张兴忠

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

提 要 本文就鲤鱼肠道细菌对其宿主的影响和细菌淀粉酶对宿主消化的影响作了探讨。从鲤鱼肠道筛选细菌菌株63株, 这批细菌中淀粉酶产生菌分布较广, 溶血毒素产生菌较少, 且产毒素的6株菌无致病性。淀粉酶活力较高的 CCI 139 菌株的淀粉酶和鲤鱼肝胰脏淀粉酶的最适 pH 和反应产物都不相同。原位酶反应法显示鲤鱼肠道食物混合液及肠壁样品中均有细菌淀粉酶。本文结果证明了鲤鱼肠道有稳定的细菌群落, 细菌淀粉酶对鲤鱼消化食物中的淀粉起了促进作用。

关键词 鲤鱼, 肠道细菌, 淀粉酶, 宿主, 消化, 促进作用

细菌是水生生物群落的重要组成之一, 但其在鱼类肠道有何功能, 甚至在鱼类肠道内是否存在稳定的细菌群落, 都曾经是有争论的问题[Hansen 等, 1992]。如 Margolis[1953]在不投饵的16尾鲶鱼中, 发现15尾没有肠道细菌, 在不投饵的3尾红点鲑中也没看到细菌, 用肠内容物培养, 虽然可以看到假单胞菌的存在, 但菌落数不多。Mattheis[1964]从24条虹鳟、7条河鳟和13条鲤科鱼的肠道中分离出219株细菌, 其中204株分属于32种、10属和5科, 在鲤科鱼类肠道中主要是假单胞菌属和气单胞菌属的菌种, 河鳟与此类似。鱼类肠道存在细菌现已被大家接受, 但细菌的功能仍不甚明了。较普遍的观点是肠道细菌仅是鱼类的共栖菌, 或者仅仅是鱼类的饵料源之一[施琼芳, 1991]。

迄今为止, 关于鱼类肠道细菌功能的报道还较少。Kashiwada 等[1970]在鲤鱼(体重70g--120g, 20-25℃)身上, 用赖氏乳杆菌(*Lactobacillus leichmanii*)对维生素 B₁₂作生物测定, 当投喂不含 B₁₂的饵料时, 在肠内仍然可以观察到大量的 B₁₂, 显然, 这些 B₁₂是由鲤鱼肠内的细菌合成的。Das 和 Tripathi[1991]研究草鱼消化酶时, 为校正肠道细菌分泌的酶所引起的误差, 用抗菌素饲喂草鱼, 然后比较实验组与对照组鱼肠道羧甲基纤维素(CMC)酶活性, 发现饲喂抗菌素草鱼的 CMC 酶比没喂抗菌素的鱼酶活低, 说明草鱼肠道有纤维素分解菌, 而且肠道细菌的纤维素酶对草鱼消化食物中的纤维素起了一定的促进作用。认识和了解鱼类肠道细菌及其胞外酶的功能, 对提高养殖鱼类的消化率及改善养殖环境都将会大有裨益。

前期实验已从鲤鱼、白鲢、草鱼和团头鲂肠道内筛出一批菌株, 并初步调查了这批菌株的胞外酶[朱晓燕, 汤伏生, 1994]。在此基础上, 本文以鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响为例, 对鱼类肠道细菌的功能作了进一步探讨。

一、材 料 和 方 法

1. 菌种、培养基、试剂和缓冲液 嗜水气单胞菌9120(产溶血毒素, 病原菌)为贺路惠赠, 淀

粉液化芽孢杆菌 RUB 500为本实验室收藏。LB 液体培养基为每升水含胰蛋白胨(oxid)10g, 酵母浸膏(oxid) 5g, 氯化钠5g, pH 7.2-7.4。LB 固体培养基为 LB 液体培养基加1.5%琼脂。SLB 为 LB 固体培养基加0.5%可溶性淀粉。标准碘液:取15ml 碘原液(碘11g 和碘化钾22g 溶于500ml 水)加碘化钾8g, 定容至500ml, 贮存备用。磷酸缓冲液(pH 6.0-8.0), 巴比妥纳-HCl 缓冲液(pH 6.8-9.6)。

2. 菌株分离和淀粉酶检测 取健康鱼肠, 分前、中、后三段解剖, 将食物取出作为食物样品, 然后剪取一定面积的肠壁, 用无菌生理盐水淋洗肠壁三次, 再将肠壁样品用无菌水漂洗一次, 加无菌水后剧烈振荡, 作系列稀释。涂布于 LB 固体平皿, 37℃ 培养过夜, 挑单菌落作扩大培养, 选菌苔形态差异较大的菌落保存。本文将食物样品中的细菌称为食物细菌, 将肠壁样品中的细菌称为肠道细菌。以样品来源和筛选的先后顺序将菌株编号, 以便后续工作。将所筛选的菌株点种于 SLB 固体平皿培养过夜, 用标准碘液显色, 有透明圈者为淀粉酶阳性。

3. 溶血毒素检测及致病实验 采鲤鱼血, 按5%加入 LB 固体培养基倒血琼脂平板, 接种细菌后37℃ 培养过夜, 观察溶血圈产生情况。将溶血毒素产生菌在 LB 平板上培养18-24小时, 用生理盐水制成浓度为 10^{5-6} 的菌悬液, 按2ml 菌液/kg 体重的比例给体重100-150g 的鲫鱼腹腔注射, 同时设阳性和阴性对照。将试验鱼饲养在19-22℃ 的清水中, 定时充氧、观察。

4. 酶活测定 细菌淀粉液化酶测定: 将 LB 过夜培养液离心取上清液, 取50 μ l 上清液与2ml 溶于缓冲液的可溶性淀粉液(2.5mg/ml) 37℃ 反应20分钟, 加1ml 2M 冰醋酸终止反应, 加标准碘液200 μ l 显色, 用比色法测定残余淀粉含量, 以相对酶活力表示活性高低。鲤鱼肝胰脏淀粉酶测定: 取肝胰脏1g, 用无菌水冲洗后加2.5ml 缓冲液(10mM Tris. Cl pH 7.5) 匀浆, 离心取上清液按上述方法测定酶活。

5. SDS-PAG 电泳后淀粉酶的原位酶反应 SDS-PAG 电泳采用 Laemmli 高 pH 不连续缓冲系统, 分离胶含0.1% 马铃薯淀粉, 预电泳(80V, 60分钟)后加浓缩胶。样品与载样缓冲液(0.125M Tris. Cl pH 6.7, 2% SDS, 2% 2-巯基乙醇, 20% 甘油)混匀后37℃ 3分钟。电泳完毕将凝胶用汤伏生、盛祖嘉[1990]的方法复性。复性后的凝胶在50mM Tris. Cl pH 7.5 缓冲液中37℃ 反应4小时, 用标准碘液显色。

二、结 果

1. 菌株分离和淀粉酶分布 从鲤鱼肠道随机分离出细菌菌株共63株, 虽然食物样品的细菌数量比肠壁样品高3~5个数量级, 但食物样品中细菌的菌落形态和生长速度等差别不大, 故取得的菌株数较肠壁样品少。从前段肠壁得到21株, 中段得16株, 后段得9株; 从前段食物样品中得到3株, 中段得12株, 后段得2株。

同时研究了肠道细菌的异动情况, 将同一批获得的新鲜鲤鱼随机分成两组, 一组当即解剖, 另一组在清水中饲喂5天后再次解剖。新鲜鲤鱼肠壁细菌量前肠壁为 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$, 中肠壁为 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, 后肠壁为 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$, 食物中细菌数量为 $1 \sim 5 \times 10^8/\text{g}$ 食物。在清水中饲养5天后, 前肠壁为 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$, 下降了33%, 中肠壁为 $3 \times 10^2/\text{cm}^2$, 下降了97%, 后肠壁为 $1.6 \times 10^2/\text{cm}^2$, 下降了97%, 食物中细菌量为 $1 \times 10^6/\text{g}$ 食物, 下降了99%。除前肠壁外, 中肠壁和后肠壁与食物中菌量的下降幅度相似。

从上述结果可以看出, 生活在前肠壁细菌, 当鱼体饥饿时, 细菌数量变化幅度并不大, 说

明这一段的细菌大部分靠吸收宿主的营养而生存;而生活在肠壁和后肠壁细菌和食物中的细菌一样,食物中细菌数量减少,肠壁细菌数量亦减少,说明这一段的细菌主要靠吸收食物中的养份而生存。

为研究肠道细菌的功能,本文调查了肠内细菌的淀粉酶产生情况,发现肠道细菌中淀粉酶分布很广,从肠壁得到的样品中,前段肠壁有33%,中段37%,后段有33%的菌株产淀粉酶;而食物细菌的淀粉酶分布却不如肠道细菌中那么广,食物样品中前段得到的3株菌均不产淀粉酶,中段有17%的菌株产淀粉酶,后段得到的2株菌均产淀粉酶。

2. 溶血毒素检测及致病实验 为研究这批菌株对鱼体的影响,本文进行了溶血实验。将菌株分别点种于鲤鱼血琼脂平板,37℃培养过夜,观察溶血圈产生情况,结果见图1。

前段肠壁未发现溶血毒素产生菌,中段肠壁有3株,占该段所得菌株的19%,后段有2株,占所得菌株的22%,食物样品中仅中段食物发现1株菌产溶血毒素。

为验证这6株溶血毒素产生菌是否对鱼体有毒,进一步进行了致病实验。以嗜水气单胞菌9120为阳性对照,以淀粉液化芽孢杆菌RUB 500为阴性对照,每组实验鱼3条,前后重复2次。实验结果显示:注射嗜水气单胞菌9120的鱼20小时内全部死亡,而注射淀粉液化芽孢杆菌RUB 500和本文所得6株溶血毒素产生菌的鱼饲养到第7天仍无死亡现象发生,且解剖显示鱼体与没注射细菌的鱼体无明显差别。说明肠道细菌虽然有一部分菌株产溶血毒素,但这批产毒株并无致病性。

3. 细菌淀粉酶与鲤鱼淀粉酶的最适 pH 将水解圈较大的淀粉酶产生菌用LB培养基培养,测定其淀粉液化酶活性,筛选了一株产酶较高且不产溶血毒素的肠道菌株CCI 139,该菌从前段肠壁分离,为细丝状,革兰氏阴性,不产芽孢。进行酶的诱导实验,发现CCI 139的液化酶为组成型酶。测定了其淀粉液化酶的pH作用范围,同时也测定了鲤鱼肝胰脏淀粉液化酶的pH作用范围,pH6.0-8.0时用磷酸缓冲液,pH6.8-9.6时用巴比妥纳-HCl缓冲液。结果见图2。

CCI 139的最适pH为8.8,在pH8.4~9.4范围内都能很好作用。而鲤鱼的最适pH为7.6,在pH7.2~8.0范围内也能很好作用。我们在筛选鲤鱼肠道细菌时测得肠内含物的pH为6.0~7.0,低于鲤鱼淀粉酶的最适pH及pH范围。在测定酶的表现最适pH时还发现,肝胰脏

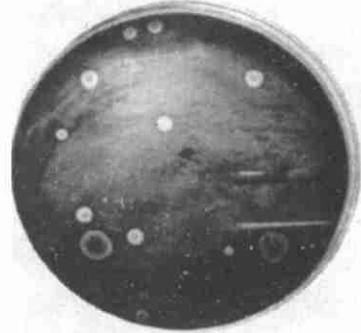


图1 产溶血毒素的肠道细菌

Fig. 1 Hemolysin producing intestinal bacteria

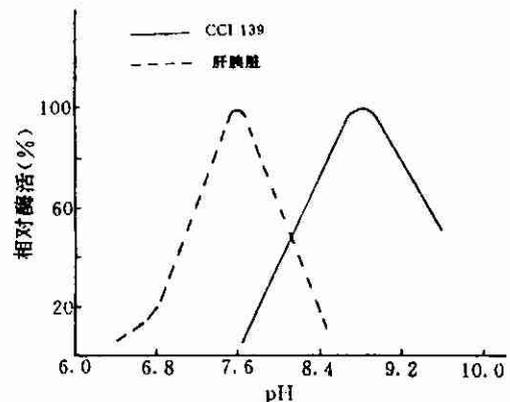


图2 CCI 139和鲤鱼肝胰脏淀粉液化酶的pH作用范围

Fig. 2 The pH range of amylases of CCI 139 and carp pancreas and liver

样品与淀粉反应产物加碘时溶液呈红棕色,说明反应产物为糊精,还需糖化酶进一步降解才能被利用。而 CCI 139 酶液与淀粉反应产物遇碘为无色,可见 CCI 139 酶液对淀粉的降解更彻底。

4. 细菌淀粉酶与鲤鱼肝胰脏淀粉酶的酶谱比较 上面通过测定细菌淀粉酶的 pH 作用范围,间接证明了细菌酶在鱼类肠道的作用。本实验试图通过电泳测定细菌淀粉酶和鲤鱼淀粉酶的泳动率来进一步证实细菌酶在鱼类消化中的作用。进行 PAG 电泳时,因凝胶中含底物,而酶与底物结合改变了酶蛋白在电场中的行为,不利于分析结果。本文先将酶变性,进行 SDS-PAG 电泳,这样泳动率直接反映了酶分子量大小,电泳完毕将酶复性,然后检测淀粉酶,即可直接观察细菌淀粉酶在鲤鱼消化中究竟起何作用。

细菌和肝胰脏酶样品如前所述,其余酶样品制法如下:取肠内食物 1g 加 2.5mL 10mM Tris. Cl pH7.5 缓冲液匀浆,离心取上清液即为食物混合物样品。将肠内食物清除后,用无菌水冲洗肠内外壁各三次,取 1g 肠组织加 2.5ml 缓冲液按上法处理得肠壁样品。将各样品 SDS-PAG 电泳后进行酶反应,显色结果见图 3。

从图中可以看出,肝胰脏淀粉酶(酶 I)分子量较大,泳动距离较短,CCI 139 淀粉酶(酶 III)分子量较小,泳动距离较长。所有肠壁样品和食物混合物样品均有肝胰脏淀粉酶(酶 I);所有肠壁样品亦有一共同酶(酶 III),此酶正好与 CCI 139 的泳动距离相近,是否为 CCI 139 淀粉酶,尚不明了。前肠壁另有一特有的酶(酶 I),此酶亦存在于中、后段食物混合物样品中;中肠壁也有一特有的酶(酶 IV),此酶亦存在于中、后段食物混合物样品中。中肠和后肠食物样品中除酶 I、酶 II 和酶 IV 外,还有一种酶(酶 V)在肝胰脏和肠壁样品中都未出现,应是肠道细菌分泌的。前肠壁的酶 I 和中肠壁的酶 IV 在其它肠壁样品中未出现,也应是细菌分泌的。本实验虽然没有在食物混合物中发现与 CCI 139 泳动率相同的酶带,但有其它细菌的酶带,说明肠道细菌的酶也有多种,在某一时刻,总有一部份细菌酶与鱼自身的酶一起作用。

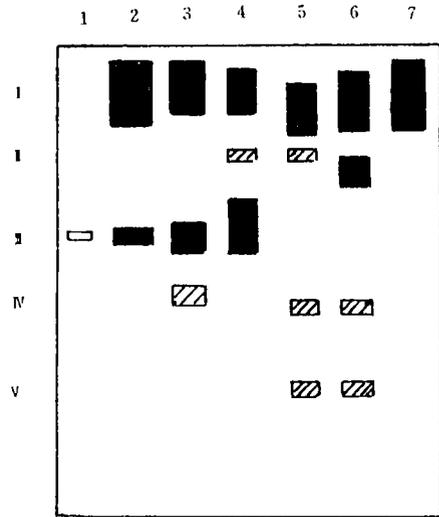


图 3 鲤鱼肠道淀粉酶酶谱
Fig. 3 Zymogram of carp intestinal amylases

1. CCI 139; 2. 后肠壁; 3. 中肠壁;
4. 前肠壁; 5. 后肠食物混合物;
6. 中肠食物混合物; 7. 肝胰脏

三、讨 论

1. 鲤鱼的肠道细菌 根据细菌在鱼类肠道的生存时间和方式,可将肠内细菌分为两类:一类细菌和食物一起侵入肠内,暂时在消化管类繁殖,但由于消化管的 pH、其他细菌的抑制,或因环境不适而全部消失,本文从食物样品中分离的菌株(食物细菌)就是这类细菌;另一类继续在消化管内存活,这类细菌是本文所称的肠道细菌。本文研究鲤鱼肠道细菌的异动情况,发现鲤鱼饥饿后,由于食物中养份减少,食物样品中细菌量减少,而肠壁样品中细菌量也相应减少,

说明肠道细菌大部份是靠吸收食物中的养份而生存的。而这批细菌在维持自己生命时合成的维生素及胞外酶对鱼体又是有利的。对肠内细菌进行溶血毒素产生菌调查,发现63株肠道细菌中有6株产毒素,而致病实验结果显示这6株菌对鱼体无毒。这些结果证明了本文所得到的这批肠道细菌中无病原菌,为鲤鱼肠道正常菌群。

2. 肠道细菌的胞外酶 鲤鱼饲料中淀粉较丰富,本文调查肠道细菌淀粉酶的分布,发现淀粉酶产生菌分布较广。尾崎久雄[1985年中译本]介绍吃甲壳质的鱼消化管内有甲壳质分解菌、食藻鱼类消化管内有木聚糖分解菌,Chao-Huang Tseng 等[1992]从丝背细鳞鲃(*Stephanolepis cirrhifer*)的肠内容物中分离出产海藻酸裂解酶的弧菌, Das 和 Tripathi[1991]报道草鱼肠道内有纤维素分解菌,这些报道与本文结果一起说明了鱼类肠道细菌和其宿主食性密切相关。由此可以推断,鲤鱼肠道细菌不仅作为鲤鱼的饵料源被利用,而且还作为共栖菌存在于鲤鱼肠道。

3. 肠道细菌淀粉酶对鲤鱼消化的影响 进一步比较细菌淀粉酶和鲤鱼肝胰脏淀粉酶的pH作用范围揭示了两者的不同,而且细菌淀粉酶对淀粉的降解比肝胰脏酶要彻底,其降解产物更利于细胞吸收。采用本文建立的 SDS-PAG 电泳后原位淀粉酶反应的方法,直接显示了鲤鱼消化液中有细菌淀粉酶的存在。尾崎久雄[1985年中译本]认为鱼类肠道 pH 是随进食、季节和鱼的生理状况等条件而变化的,本文测得鲤鱼肠内含物的 pH 为 6.0-7.0,低于鲤鱼淀粉酶的 pH 范围,这一结果再次验证了尾崎的推论。鲤鱼肝胰脏淀粉酶的 pH 是固定的,而鲤鱼肠道的 pH 是变化的,肠道细菌淀粉酶的存在增加了鲤鱼肠道酶的多样性,对鱼体更好地吸收营养、适应环境是很有帮助的。

鲤鱼肠道细菌中无病原菌,肠道细菌的分布又与宿主食性密切相关,而且细菌淀粉酶不论在 pH 作用范围还是在底物的降解方面都为鲤鱼消化作了贡献。这些结果证明了鲤鱼肠道中存在稳定的细菌群落,细菌淀粉酶对宿主消化食物中的淀粉起了促进作用。

第二作者现任湖北农学院(荆州,434103)水产系讲师。

参 考 文 献

- [1] 朱晓燕、汤伏生,1994.健康家鱼肠道细菌中的嗜水气单胞菌及其胞外酶分布.湖北农学院学报,14(1):35-39.
- [2] 汤伏生、盛祖嘉,1990.FD DNA 多聚酶 I SDS-PAG 电泳后的原位酶反应.武汉大学学报(自然科学版)(生物工程专刊),(12):57-60.
- [3] 施璩芳,1991.鱼类生理学,126-127.农业出版社(京).
- [4] 尾崎久雄(李爱杰、沈忠武译),1985.鱼类消化生理,388-417.上海科学技术出版社.
- [5] Chao-Huang Tseng *et al.*, 1992. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. 日本水产学会誌,58(3):533-538.
- [6] Das, K. M. and S. D. Tripathi, 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture*, 92(1):21-30.
- [7] Hansen, G. H. *et al.*, 1992. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of Herring (*Clupea harengus*) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(2):461-470.
- [8] Kashiwada, K. *et al.*, 1970. Studies on the production of B vitamins by intestinal bacteria of fish. V. Evidence of the production of vitamin B by microorganisms in the intestinal cannal of carp, *Cyprinus carpio*. 日本水产学会誌,36(4):421-424.
- [9] Margolis, L., 1953. The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 10

(2):62-63.

[10] Mattheis, T., 1964. Ökologie der Bakterien im Darm von süßwassernutzfischen. *Z. Fischerei.*, 12:507-600.

THE INFLUENCES OF COMMON CARP INTESTINAL BACTERIA AND ITS AMYLASES ON THE HOST DIGESTION

Tang Fusheng, Zhu Xiaoyan and Zhang Xingzhong

(*Changjiang Fisheries Research Institute of CAFS, Shashi, 434000*)

ABSTRACT This paper deals with the influence of intestinal bacteria on common carp (*Cyprinus carpio*) and bacterial amylases on the host digestion. Sixty three strains of bacteria have been isolated from carp intestines and intestinal foods in this connection. The distribution of amylase and hemolysin producing strains among the intestinal bacteria has also been investigated. The distribution of amylase producing strains is broad, while that of hemolysin is narrow, and these hemolysin producing strains are not lethal to fish. These results indicate that there were no pathogens among the intestinal bacteria obtained in this experiment. Furthermore, the carp amylase had an apparent optimal pH of 7.6 and worked well between 7.2 to 8.0. The CCI 139 (one strain whose production of amylase was higher than that of other strains) amylase had an apparent optimal pH of 8.8 and worked well between 8.4 to 9.4, while the pH of intestinal mixture ranged from 6.0-7.0. Finally, the in situ reaction of amylases after SDS-PAGE has convinced that there were bacterial amylases in carp intestinal mixture. The results mentioned above show that there are stable microflora in common carp intestines and bacterial amylases play a promoting effect on starch digestion by host.

KEYWORDS common carp, intestinal bacteria, amylase, host digestion, promoting effect