

魚類腸内細菌相の分子生態学的研究

日本大学大学院農学研究科水産学専攻

博士後期課程

Maidie Asfie

2000

目次

魚類腸内細菌相の分子生態学的研究

第1章	緒論.....	1頁
第2章	培養法による沿岸魚類およびキングョの 腸内細菌相の測定.....	8
第3章	FISH法による魚類腸内細菌相の測定.....	14
第4章	淡水魚類腸内細菌相の日別変動.....	25
第5章	淡水魚類の消化管各部位の細菌相.....	31
第6章	総括.....	38
謝辞.....		43
参考文献.....		44

日本大学大学院農学研究科水産学専攻

博士後期課程

Maidie Asfie

2000

目次

第1章	緒論.....	1 頁
第2章	培養法による沿岸魚類およびキングヨの腸内細菌相の測定.....	8
第3章	FISH 法による魚類腸内細菌相の測定.....	14
第4章	淡水魚類腸内細菌相の日別変動.....	25
第5章	淡水魚類の消化管各部位の細菌相.....	31
第6章	総括.....	38
謝辞.....		43
参考文献.....		44

第1章 緒論

地球上の水、土壌および大気には種々の細菌が存在し、それぞれの場所に特有の細菌相 (bacterial flora または microflora) を形成している。また細菌は大部分の動植物の体表や器官などにも存在し、そこでも特有の細菌相を形成していることが多い。例えば、ヒト (*Homo sapiens*) の腸管内には内容物 1g あたり数千億細胞、約 400 種の細菌が存在することが知られている (Hooper et al., 1998; Blaut, 1999)。このように腸管内に多量の微生物が存在する事実は、これらの微生物が宿主に何らかの影響を及ぼしていることを予想させる。また胎児の腸管内はもともとは無菌状態であるが、出産時に母体や産院内の環境から多くの細菌が腸管に侵入するため、生後 1 週間程度で乳児に固有の微生物相が形成される (光岡, 1978)。Dubos et al. (1965) は、マウス (*Mus musculus*) およびラット (*Rattus norvegicus*) の腸管内における細菌の生態について研究し、腸内細菌を①長期間の進化の過程を通して存在し、かつ宿主の生涯にわたって定着している原住菌 (autochthonous microbiota)、②ある環境下の宿主に偏在して優占的に定着している正常細菌 (normal microbiota) および③偶然に宿主に入り込んで定着する病原菌 (pathogen) に分類し、これらを統一して固有細菌 (indigenous bacteria) と呼んだ。これに対し Savage (1977) は腸内細菌群を①ある動物種の全個体に存在する原住細菌相 (autochthonous flora) と、②一過的に消化管に存在し、必ずしもすべての個体には存在しない外来細菌相 (allochthonous flora) に分類し、両者をあわせて正常細菌相 (normal flora) と呼んだ。また原住菌はヒトの生存に欠かせないことが van der Waaj (1989) によって指摘されている。原住菌は抗菌物質などを生産し

て病原菌の腸管への定着を阻止する生体防御機構の1つとして機能するため、外来の病原菌から宿主を保護している。

原住菌の役割にはこのほかに、ビタミン K や B₁₂ の生産が挙げられる。これらのビタミンは原住菌によって腸管内で生産され、一部が宿主によって吸収され、栄養分として利用される (Hooper et al., 1998)。

細菌が腸管内で定着するためには、まず細菌が腸管内壁に付着する必要がある。とくに多くの腸管内感染症では、感染症成立の第一条件として病原菌が宿主の腸管に付着することが知られている (Hicks, 1996)。そのため多くの病原菌では動物の腸管に付着する機構が解明されている。病原細菌が腸管に付着するための条件としては、① 走化性および運動性があること (Freter et al., 1981)、② Colonization factors antigen I, II および type 1 fimbriae をもつこと (Knutton et al., 1984, 1985)、③ プラスミド pMAR2 をもつこと (Knutton et al., 1987)、④ 未同定の付着物質 (Yamamoto et al., 1991) をもつことなどが知られているが、これらは付着素 (adhesin) と呼ばれている (Jann and Hoschutzky, 1990)。これに対し、病原菌ではない原住菌や正常細菌がどのような機構で腸管に付着するかについてはほとんど解明されていない (Hooper et al., 1998)。

ヒトを含む陸上哺乳類の腸管内では時間や部位によって細菌の組成や密度が大きく変動することが知られている (Hooper et al., 1998)。また宿主の年齢、食餌の種類や成分、宿主の生息環境 (気圧など) などが腸内細菌相に影響を及ぼすことも報告されている (Savage, 1977)。さらにこれら腸内細菌が陸上哺乳類の生理、栄養、疾病、発癌などに関与していることも解明されつつある (光岡, 1978)。

一方、魚類と細菌の間にも、陸上哺乳類と同様、多くの点で密接な関係があることが予想されるが、陸上動物と比べ、研究の歴史が浅いため、不明な点が多く残されている。例えば、ボラ (*Mugil cephalus*) や *Tachyrius arius* では、何のために発光細菌が発光するのか不明である (Hastings and Neelson, 1977; Ramesh and Venugopalan, 1988)。これまでの研究から魚類の腸内細菌相は陸上恒温動物の腸内細菌相よりも単純な構成であり、その大部分は好気性細菌 (通性嫌気性細菌を含む) であることが知られている (Trust and Sparrow, 1974; Horsley, 1977)。しかし 1979 年にカナダ・ビクトリア大学の Trust et al. が *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* などの嫌気性細菌をソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*)、キンギョ (*Carassius auratus*) およびニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の腸管から分離して以来、嫌気性細菌が注目されるようになった (上村ら, 1997; 杉田, 2000)。Sakata et al. (1980) は 6 種類の淡水魚類から 2 種類の新しい嫌気性細菌を分離し、*Bacteroides* A 型菌および *Bacteroides* B 型菌と命名した。また Dyrset et al. (1984) は海産魚の capelin (*Mallotus villosus*) の腸管から *Bacteroidaceae* を分離した。菌である *Vibrio* 科 (*Vibrionaceae*) および腸内

これらの細菌と魚類の関わりは卵の段階から始まる。自然水域では魚の生息する水からは、通常、生菌数で $10^3 \sim 10^8$ CFU (colony forming unit) / mL の細菌が検出される (Scholes and Shewan, 1964; 吉水ら, 1980; Sugita et al., 1983; Boyd et al., 1984; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Pettibone, 1998)。そのために産卵直後の魚卵表面には水中や底泥、産卵床などの細菌が付着し、そこで増殖したり、ときには卵内に侵入して胚を死に追いやることさえある (Hansen and Olfasen, 1989)。卵の外面に付着

している細菌数は $10^3 \sim 10^6$ CFU/g 程度であることが報告されている (吉水ら、1980; Sugita et al., 1988b)。鮭鱒類やキンギョなどの淡水魚類の卵では *Aeromonas*、*Pseudomonas*、*Cytophaga* および *Flavobacterium* などが優占することが知られている (Bell et al., 1971; 吉水ら、1980; Sugita et al., 1988b)。probiotics) についての研究が報告されている (Fox, 1988; Fuller, 1989)。

孵化するまでの魚類の腸管は多くが無菌状態であると考えられているが、孵化して卵膜内から外界に出て周囲の水を飲み込むとき、一緒に水中の細菌を消化管内に取り入れることになる (Mangor-Jensen and Adolf, 1987; Tytler et al., 1990; Olfasen and Hansen, 1992)。また魚類の腸内細菌相は飼餌料、環境条件、成長段階などの影響を受けることが多くの研究者によって報告されている (吉水ら、1980; 杉田ら、1982; Campbell and Buswell, 1983; Muroga et al., 1987; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Cahill, 1990; Bergh et al., 1994)。これら魚類の腸管における細菌の役割については現在も研究が進められている。

細菌は魚類の病原体として養殖業に多大な被害をもたらすことが知られている。とくにグラム陰性発酵細菌である *Vibrio* 科 (*Vibrionaceae*) および 腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) に属する細菌は魚類の病原菌として重要である (Trust, 1986; Moriarty, 1997)。*Vibrio anguillarum* などいくつかの病原菌の感染経路が魚類の腸管であることが Olsson et al. (1996) によって報告されている。これらの細菌は腸管に入り込み腸管の壁部に付着するとともに (Horne and Baxendale, 1983; Chen and Hanna, 1992)、protease を生産して宿主の腸管の組織を破壊する (Gudmundsdottir, 1996; Sugita et al., 1998a)。またこれらの病原菌の中には宿主が飢餓状態でも長期間腸管内に留ま

れることが知られている (Husevag, 1995)。

腸管性感染症を防除するためには、これまでにワクチンや血清など免疫学的手法が取られてきた (Hart et al., 1988)。しかしヒトや畜産領域では腸内細菌相のバランスを改善することによって宿主の健康状態を保持するための生菌製剤 (probiotics) についての研究が報告されている (Fox, 1988; Fuller, 1989)。魚類の腸管内にも魚類病原細菌に対して抗菌活性を示す細菌が分離されている (Dopazo et al., 1988; Westerdahl et al., 1991; Olsson et al., 1992; Sugita et al., 1996b, 1996c, 1997b, 1998c)。とくに近年、*Lactobacillus* や *Carnobacterium* などの乳酸桿菌が鮭鱒類やタラ (*Gadus morhua*)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) などの疾病予防のための生菌製剤として効果があることが実験的に証明されている (Byun et al., 1997; Gildberg et al., 1997; Joborn et al., 1997; Kvasnikov et al., 1977; Ringo and Gatesoupe, 1998; Ringo et al., 2000; Robertson et al., 2000)。Probiotic の定義を考えると、病原菌の防止だけでなく、幅広いの使い方も可能である。この他、魚類病原細菌に阻害効果のある細菌を直接飼育水に投与して疾病の発生を抑制するバイオコントロールの試みもなされている (Gatesoupe, 1999; Maeda et al., 1997; Moriarty, 1997; Skjermo and Vadstein, 1999)。

植食性、雑食性および肉食性の魚類の消化管内では、消化しにくい食物成分を腸内細菌が分解し、宿主の消化を助けていることが考えられる (Rimmer and Wiebe, 1987; Smith et al., 1996; Sugita et al., 1998b)。腸内細菌の生産する amylase はデンプンを消化する (Sugita et al., 1996a, 1997a)。キチンは細菌の生産する chitinase や β -N-acetylglucosaminidase によって腸管内で分解される (Lindsay and Gooday, 1985; Sugita et al., 1999)。さら

に腸内細菌の中には B_{12} やビオチンなどの B 群ビタミンを生産して宿主魚類のビタミン要求を満たしていることが淡水魚類では報告されている (Sugita et al., 1991a, 1992)。またフグ毒として知られている tetrodotoxin がショウサイフグ (*Fugu vermicularis vermicularis*) やクサフグ (*Fugu niphobles*) の腸内細菌などによって生産されることも判明している (Noguchi et al., 1987; 杉田・出口, 1988; Sugita et al., 1989c; 塩見, 1994; Scoging, 1998)。

これらの研究の大部分は培養法に基づいて行われてきた。しかし培養法に基づいた細菌相の測定には多大の労力や経験が必要である。また純粹分離した細菌をせいぜい 10 程度の性状に基づいて同定しているため、正確に同定することは困難であった。さらに近年の研究では生存していても培養できない VBNC (Viable but non-culturable) の細菌が自然界には多く存在することが報告されている (Muyzer, 1998; O'Sullivan, 1999)。杉田ら (1981b) はコイ (*Cyprinus carpio*)、キンギョおよびティラピア (*Oreochromis niloticus*) の腸管内容物では直検法による総菌数と培養法による総生菌数の間に差があることを報告している。このような多くの問題点が魚類の腸内細菌相に関する研究の大きな障害となっていた。しかし近年の分子生物学の進歩によって培養法によらない細菌相の測定法がいくつか開発された (O'Sullivan, 1999)。そこで本研究ではその中の 1 つである FISH 法 (Fluorescence in situ hybridization method) が腸内細菌の測定に有効であるか否かを検討した。研究の概要は以下の通りである。

第 6 章は、上記の結果を中心に総合的考察を行ったものである。

まず第 2 章では沿岸魚類のヒラメ、マアジ (*Trachurus japonicus*)、ヒイラギ (*Leiognathus nuchalis*) およびアカカマス (*Sphyrna pinguis*) と淡

水魚類のキンギョの腸内細菌相を培養法に基づく従来法で求めた。その結果、多くの沿岸魚類の腸管内には好気性細菌である *Vibrio* 属細菌が優占するが、嫌気性細菌は少ないことが判明した。これに対してキンギョでは好気性の *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio* および嫌気性の *Bacteroidaceae* が優占した。また分離菌株の系統解析を行った結果、8 群に分類された。その中には2種類の嫌気性細菌が含まれることなどから、淡水魚類には好気性細菌のほかに嫌気性細菌も優占することが示唆された。

第3章では rDNA の各細菌群に特有の配列を標的とした蛍光プローブを用いる FISH 法が魚類腸内細菌相の測定に有効であるか否かを淡水魚を用いて検討した。その結果、検出できる菌数は培養法よりも多く、かつプローブ間の計数值にも高い相関関係が得られるなどのことから、FISH 法が魚類腸内細菌相の測定に極めて有効であることが判明した。

第4章では FISH 法を用いてキンギョ糞便中の細菌相を経時的に測定し、キンギョの腸内には古細菌、*Aeromonas* および *Acinetobacter* が優占的に常在していることを見いだした。さらにこれらの細菌相には顕著な個体差および日別変動があることも見いだした。

第5章ではキンギョ、コイおよびティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の消化管各部位における細菌相を調べ、いずれの魚種も腸管前部、同中部、同後部の順に計数值が増加することから、これらの魚種では内容物が消化管内を移動することに伴い腸内細菌が増殖していることが判明した。

第6章は、上記の諸結果を中心に総合的考察を行ったものである。

1998年6月16日に神奈川県藤沢市江ノ島沿岸で地引き網によって採取したマアジ(体重 258~380 g)、ヒイラギ(同 26.7~75.1 g) およびアカカマス

**STUDI EKOLOGI MOLEKULER PADA MICROFLORA
DI INTESTINE IKAN**

**PROGRAM STUDI ILMU PERIKANAN
PASCA SARJANA PERTANIAN
NIHON UNIVERSITY**

Program Doktor

Maidie Asfie

2000

Daftar Isi

BAB 1. Intisari.....	Halaman	1
BAB 2. Analisis Microflora Intestine pada Ikan-ikan Pantai dan Ikan Maskoki		8
BAB 3. Analisis Microflora Intestine Ikan dengan Menggunakan Metode FISH		14
BAB 4. Perubahan Harian Microflora Intestine Ikan Air Tawar		25
BAB 5. Perubahan Microflora Intestine Ikan Sesuai Bagian Saluran Pencernaan		31
BAB 6. Kesimpulan Umum		38
Ucapan Terimakasih		43
Daftr Pustaka		44

BAB 1. Dasar Teori Utama

Di permukaan Bumi: air, tanah, dan udara mengandung bakteri yang masing-masing memiliki ciri khusus (disebut bacterial flora atau microflora). Microflora hidup pada makhluk hidup lain baik di permukaan dan di dalam tubuh, yang akibat dari ini akan menyebabkan munculnya ciri-ciri khusus yang beragam. Misal, intestine pada manusia (*Homo sapiens*) dengan berat sekitar 1 g akan dihuni oleh beberapa ribu bakteri, atau sekitar 400 species (Hooper et al., 1998; Blaut, 1999). Dengan kenyataan bahwa di intestine organisme adalah habitat dari tak terhitung jumlahnya microflora, maka menjadi pertanyaan apakah manfaat yang diberikan dengan kehadiran microflora tersebut. Begitu juga pada saat bayi yang belum dilahirkan, pada saluran intestinenya adalah steril dari microflora, tapi ternyata setelah dilahirkan saluran intestinenya menjadi penuh dengan microflora berasal dari tubuh ibu dan lingkungan tempat kelahiran (Hikarioka, 1978). Dubos et al. (1965) meneliti microflora di intestine mouse (*Mus musculus*) dan rat (*Rattus norvegicus*), dan menyimpulkan bahwa microflora: (1). Mengikuti perubahan evolusi dari inang dan menjadi microflora utama yang disebut autochthonous microbiota, (2). Pada lingkungan tertentu menjadi microflora yang utama dan hadir secara normal atau normal microbiota, dan (3) Microflora yang secara kebetulan masuk dan berkoloni dan memiliki sifat pembawa penyakit (pathogen). Semua ketiga jenis microflora ini disebut indigenous bacteria. Sementara itu Savage (1977) mengelompokkan microflora yang hadir pada intestine inang ke dalam: (1) Microflora yang hadir di semua jenis hewan atau disebut autochthonous flora, dan (2) Microflora yang hadir untuk sementara waktu atau allochthonous flora. Kedua kelompok microflora ini disebut normal flora. Microflora yang tidak boleh tidak harus hadir pada inang, oleh van der Waaj (1989) menyebutkan salah satu fungsinya adalah untuk menghasilkan senyawa antibacterial dan produk lainnya untuk mencegah kolonisasi microflora penyebab penyakit untuk berkoloni di saluran intestine.

Selain berfungsi dalam mencegah bakteri penyebab penyakit untuk berkolonisasi di intestine, bakteri autochthonous juga berfungsi dalam memproduksi vitamin K, dan B12 bagi inang. Kehadiran autochthonous microflora adalah hal yang tak bisa dihilangkan dalam memberikan nutrisi tertentu bagi inang (Hooper et al., 1998).

Untuk berkoloni di dalam intestine, microflora harus menempel pada dinding dalam saluran intestine. Begitu juga yang terjadi untuk bakteri penyakit, penempelan pada dinding

intestine inang adalah hal pertama yang harus dilakukan (Hicks, 1996). Sudah cukup banyak mekanisme penempelan bakteri penyakit pada dinding intestine yang diketahui hingga saat ini. Untuk penempelan bakteri penyakit, seharusnya bakteri (1) bersifat motil (Freter et al., 1981), (2) Adanya colonization factors antigen I, II, dan memiliki fimbriae type1 (Knutton et al., 1984, 1985)), (3) memiliki Plasmid pMAR2 (Knutton et al., 1987), (4) Senyawa penempelan yang belum diketahui (Yamamoto et al., 1991), yang hanya disebut sebagai adhesin (Jann and Hoschutzky, 1990). Sedangkan microflora yang bukan bersifat sebagai penyakit yaitu autochthonous biota dan normal microbiota, hingga saat ini belum diketahui dengan jelas mekanisme penempelannya (Hooper et al., 1998).

Pada manusia dan hewan mamalia daratan lainnya, waktu dan tempat mempengaruhi keberadaan microflora yang menyusunnya. Perubahan microflora bisa terjadi secara besar-besaran (Hooper et al., 1998). Usia, jenis makanan, dan lingkungan hidup inang (misal tekanan udara) sangat mempengaruhi perubahan microflora yang ada di intestine (Savage, 1977). Hal yang sama juga dijelaskan oleh Hikarioka (1978) bahwa fisiologi, nutrisi, penyakit, dan stress adalah berhubungan dalam menyebabkan perubahan microflora pada intestine.

Sedangkan pada jenis ikan, keberadaan microflora, mirip dengan mamalia daratan, sangat berkaitan dalam beberapa hal, yang jika diperbandingkan bahwa studi tentang bakteri pada jenis ikan adalah masih sangat kurang, sehingga masih banyak hal-hal yang belum jelas. Misal, pada ikan belanak (*Mugil cephalus*) ataupun *Tachyurus arius*, belum dapat dijelaskan mengapa ada simbiosis bakteri bercahaya hidup pada organ tubuhnya (Hastings and Neilson, 1977; Ramesh and Venugopalan, 1988). Hingga saat ini, baru dapat disimpulkan bahwa pada jenis ikan susunan microfloranya adalah lebih sederhana dibanding pada hewan berdarah panas daratan. Microflora pada jenis ikan adalah umumnya bakteri aerobik dan bakteri facultative anaerobic (Uemura, 1977; Sugita, 2000). Sakata et al. (1980) telah menemukan 2 species bakteri obligate anaerobic pada 6 jenis ikan air tawar, yaitu species *Bacteroides* type A dan *Bacteroides* type B. Sedangkan Dyrset et al. (1984) pada intestine ikan capelin (*Mallotus villosus*) pun telah ditemukan group bakteri *Bacteroidaceae*.

Keterkaitan antara microflora dan inang ikan sebenarnya telah dimulai sejak ikan masih dalam tahap telur. Pada lingkungan perairan alami, media air tempat hidup ikan normalnya memiliki kepadatan bakteri antara $10^3 - 10^8$ CFU (colony forming unit)/mL (Scholes and

Shewan, 1964; Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1983; Boyd et al., 1984; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Pettibone, 1998). Penyebab utamanya adalah pada saat telur menetas, di permukaannya akan menempel bakteri yang berasal dari sedimen, air, dan tempat telur menempel, yang selanjutnya akan meningkat populasinya, dan bahkan menginfeksi telur yang berakibat embrio menjadi mati (Hansen and Olfasen, 1989). Bakteri yang menempel di permukaan luar telur berkisar 10^3 - 10^6 CFU/g (Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1988b). Pada ikan salmon ataupun ikan mas koki yang merupakan jenis ikan air tawar, pada telurnya terdapat mikroflora *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga* dan *Flavobacterium* yang menjadi mikroflora utama yang terdapat di permukaan luar telur (Bell et al., 1971; Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1988b).

Hingga telur menetas, intestine ikan adalah steril dari bakteri, tetapi begitu telur menetas dan larva ikan mulai meminum air, maka mikroflora akan masuk ke saluran pencernaan bersamaan dengan kegiatan minum (Mangor-Jensen and Adolf, 1987; Tytler et al., 1990; Olfasen and Hansen, 1992). Selanjutnya, dari pakan, lingkungan, dan tingkatan pertumbuhan masing-masing memberikan pengaruh dalam komposisi mikroflora pada intestine ikan (Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1982; Campbell and Buswell, 1983; Muroga et al., 1987; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Cahill, 1990; Bergh et al., 1994). Peranan dari mikroflora di intestine ikan terus diteliti hingga saat ini.

Bakteri penyebab penyakit menyebabkan banyak kerusakan dalam perikanan. Utamanya bakteri Gram negative Family *Vibrio* (*Vibrionaceae*) dan *Enterobacteriaceae* (Trust, 1986; Moriarty, 1997). *Vibrio anguillarum* dan species lainnya menjadikan intestine sebagai pintu masuk yang utama seperti yang dilaporkan oleh Olsson et al (1996). Species bakteri patogen ini akan menempel pada dinding intestine (Horne and Baxendale, 1983; Chen and Hann, 1992), dan mengeluarkan protease untuk merusak dinding intestine (Gudmundsdottir, 1996; Sugita et al., 1998a). Bakteri penyebab penyakit ini bahkan pada ikan-ikan yang kelaparan, akan tetap hidup di intestine dalam waktu yang panjang (Husevag, 1995).

Untuk mencegah penyakit pada intestine yang disebabkan oleh kolonisasi bakteri penyakit, telah dilakukan upaya melakukan vaksin ataupun pemurnian darah secara ilmiah (Hart et al., 1988). Tetapi, pada manusia dan hewan ternak sekarang ini telah dilakukan usaha pemberian bakteri hidup atau probiotik untuk membuat keseimbangan mikroflora di dalam

intestine untuk menjaga kesehatan tubuh inang (Fox, 1988; Fuller, 1989). Begitu juga pada species ikan, belakangan ini telah dikembangkan microflora hidup probiotik yang bisa untuk mencegah perkembangan bakteri penyakit (Dopazo et al., 1988; Westerdahl et al., 1991; Olsson et al., 1992; Sugita et al., 1996b, 1996c, 1997b, 1998c). Akhir-akhir ini, microflora dari species *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, dan lainnya dari group bakteri asam laktat, telah digunakan sebagai probiotik untuk ikan cod (*Gadus morhua*), ikan sebelah (*Paralichthys olivaceus*) dan lainnya (Byun et al., 1997; Gildberg et al., 1997; Jobvorn et al., 1997; Kvasnikov et al., 1997; Ringo and Gatesoupe, 1998; Ringo et al., 2000; Robertson et al., 2000). Kemampuan probiotik tak hanya untuk mencegah penyakit, tetapi juga dapat digunakan dalam situasi yang lebih luas. Apabila bakteri hidup ini disebarkan di media hidup ikan, ini juga akan memberikan dampak perlindungan dalam mencegah penyakit yang disebut sebagai biokontrol (Gatesoupe, 1999; Maeda et al., 1997; Moriarty, 1997; Skjermo and Vadstein, 1999).

Pada ikan-ikan herbivore, omnivore dan carnivore, microflora yang hidup di intestine akan mencerna bahan makanan menjadi nutrisi yang lebih mudah untuk diserap inang, sehingga dapat dikatakan microflora yang hidup di intestine adalah berfungsi utama dalam membantu pencernaan inang (Rimmer and Wiebe, 1987; Smith et al., 1996; Sugita et al., 1998b). Amylase yang diproduksi oleh microflora intestine membantu dalam proses pencernaan amilum (Sugita et al., 1996a, 1997a). Chitin dan β -N-acetylglucosaminida dibantu pencernaannya oleh chitinase yang dihasilkan microflora intestine (Lindsay and Gooday, 1985; Sugita et al., 1999). Selain itu vitamin B12 dan biotin dari group vitamin B dihasilkan oleh microflora intestine untuk ikan inangnya (Sugita et al., 1991a, 1992). Selain nutrisi bermanfaat, produk toxin kuat tetrodotxin pada ikan buntal *Fugu vermicularis vermicularis* dan *Fugu niphobles* juga dihasilkan oleh microflora intestine (Noguchi et al., 1987; Sugita and Deguchi, 1988; Sugita et al., 1989c; Shiomi, 1994; Scoging, 1998).

Pada banyak penelitian yang telah dilakukan, sebagian besar berdasar pada kultur microflora pada media agar padat dan cair. Tetapi, metode kultur dalam pengidentifikasian microflora ini mendapat kesulitan dari biaya yang besar dan sangat tergantung pengalaman dari si peneliti. Selain itu, kultur murni dari microflora-pun pada dasarnya hanya sekitar 30% yang bisa teridentifikasi dengan tepat, lainnya adalah sulit untuk teridentifikasi. Tambahan lagi, pada tahun-tahun terakhir ini bakteri-bakteri yang bersifat ada tetapi tak bisa dikultur atau viable but-

nonculturable semakin banyak juga ditemukan di alam (Muyzer, 1998; O'Sullivan, 1999). Sugita et al (1981b) telah menemukan kecenderungan terjadi perbedaan besar dalam jumlah dan jenis dari mikroflora intestine dari hasil metode kultur dengan metode perhitungan langsung pada mikroflora intestine ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan mas koki (*Carassius auratus*), dan nila (*Oreochromis niloticus*). Dengan adanya banyak masalah dalam analisis mikroflora intestine ikan, sehingga akhir-akhir ini digunakan analisis ekologi molekuler untuk mengatasi kelemahan metode kultur mikroflora. Beberapa metode analisis selain metode kultur telah dipublikasikan (O'Sullivan, 1999). Dari beberapa metode itu, salah satunya yaitu metode FISH atau Fluorescence in situ hybridization method) telah dilakukan uji coba untuk mengetahui ada tidaknya kemampuannya dalam menganalisis mikroflora intestine ikan. Dengan demikian, penelitian untuk disertasi ini berlangsung seperti di bawah ini:

BAB 2 adalah melakukan analisis jenis dan kelimpahana mikroflora intestine ikan pantai maaji *Trachurus japonicus*, hiiragi *Leiognathus nuchalis* dan akakamasu *Sphyrna pinguis*, serta ikan air tawar iakan mas koki secara metode kultur. Ditemukan bahwa Genus *Vibrio* adalah genus dominan, dan bakteri anaerobic obligate ditemukan dalam jumlah sedikit. Sedangkan pada ikan mas koki, bakteri aerobic *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, dan bakteri anaerobic obligat *Bacteroidaceae* adalah yang mendominasi. Hasil uji vilogenetik menunjukkan mikroflorateridentifikasi terkelompok kedalam 8 group, yang di dalamnya terdapat 2 species bakteri anaerobic obligate. Sedangkana pada ikan air tawar, bakteri aerobic dan bakteri anaerobic adalah yang utama.

Pada **BAB 3**, rDNA yang terdapat pada tiap kelompok mikroflora dianalisis dengan menggunakan probe berfluorescent pada rantai khusus DNA pencari species atau group (metode FISH). Studi ini dilakukan untuk mengetahui apakah metode ini cukup kuat untuk menganalisis mikroflora pada intestine ikan. Hasilnya menunjukkan bahwa mikroflora yang semula tidak banyak ditemukan jumlahnya, ternyata dengan metode FISH berhasil ditemukan lebih tinggi. Dengan demikian, metode FISH bisa digunakan untuk menganalisis mikroflorapada intestine ikan.

BAB 4 dilakukan analisis mikroflora pada kotoran atau feces ikan mas koki, dan ditemukan bahwa *Archaea*, *Aeromonas*, dan *Acinetobacter* adalah mikroflora utama. Selain itu

diketahui pula bahwa jumlah dan jenis mikroflora berfluktuasi kuat dari hari ke hari, dan dari individu ke individu.

BAB 5 adalah studi mengenai perbedaan kualitas dan kuantitas mikroflora berdasarkan bagian dari intestine ikan mas koki, mas, dan nila (*Oreochromis mossambicus*). Semua species ikan ini memiliki kecenderungan bahwa bagian depan, tengah, dan khir saluran intestine memiliki jumlah dan jenis mikroflora yang berbeda, dimana semakin meningkat ke arah bagian akhir dari intestine. Hal ini memperlihatkan, isi dari intestine yang terus bergerak ke bagian anus dapat menyebabkan populasi dan jenis mikroflora juga akan semakin meningkat.

BAB 6 adalah merupakan pembahasan utama dari masing-masing bab.