

柴虹,潘海珠,胡浩. 酪酸梭菌与粪肠球菌的混合培养[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):279-280.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.092

酪酸梭菌与粪肠球菌的混合培养

柴虹,潘海珠,胡浩

(江苏远山生物技术有限公司,江苏盐城 224002)

摘要:为了确定酪酸梭菌与粪肠球菌混合培养方法,从2种菌接种顺序及接种时间、混合培养基中碳源、氮源添加比例等方面进行了研究。结果表明,混合培养基中葡萄糖添加0.5%、酵母粉添加0.8%、酪酸梭菌接种混合培养基培养8 h后接种粪肠球菌、混合培养20 h后酪酸梭菌活菌数比单独培养时稍高,芽孢率稍有下降;混合培养的粪肠球菌活菌数比单独培养时大幅增加,为单独培养时的2.4倍。

关键词:酪酸梭菌;粪肠球菌;混合培养;动物肠道

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0279-02

酪酸梭菌又名丁酸梭菌,是农业部近几年新批准使用的高安全性添加剂品种,该菌能调节动物肠道菌落平衡,抑制肠道有害菌生长^[1-2]。该菌分泌的重要营养物质酪酸(丁酸)能修复受损伤的肠黏膜,促进其再生^[3-5]。乳酸粪肠球菌是目前微生态制剂主要菌种之一,该菌可与动物肠道中有益微生物共生,具有改善动物胃肠道环境、促进动物生长和提高生产性能等作用^[6]。这2种菌在动物饲养领域均具有很高的利用价值。通过长期的生产实践,人们发现有些益生菌之间有共生作用,发酵产物可以互为利用,从而达到互利共栖的效果。已有研究表明酪酸梭菌与乳酸菌混合培养可显著提高生物量和生理代谢功能,能产生优于纯培养的效果。王松丽等研究表明,酪酸梭菌与鼠李糖乳杆菌混合培养生物量大幅提高,混合培养液对常见肠道致病菌具有更强的抑菌活性^[7]。吕存女等试验证明,酪酸梭菌与婴儿双歧杆菌两菌联合比单独培养时显示出更强的生物拮抗作用^[8]。本试验在2种菌单独培养技术成熟的基础上,尝试将其混合培养,探索酪酸梭菌与乳酸粪肠球菌的共生关系。结果表明,两者在混合培养基中表现出互惠共生的关系,其生物量均有提高。该方法用于大生产中可提高产率、降低成本,具有较高的实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 酪酸梭菌(*Clostridium butyricum*) JYS-1株、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) JYS-2株,以上2个菌株为江苏远山生物技术有限公司实验室保留菌株。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 粪肠球菌计数培养基:蛋白胨3 g/L,胰酪蛋白胨17 g/L,酵母粉5 g/L,牛胆粉10 g/L,氯化钠5 g/L,七叶苷1 g/L,柠檬酸铁胺0.5 g/L,叠氮化钠0.25 g/L,柠檬酸钠

1 g/L,琼脂粉15 g/L;pH值6.9~7.3。

1.1.2.2 酪酸梭菌计数培养基:葡萄糖10 g/L,酵母粉8 g/L,氯化钠2 g/L,硫酸镁0.5 g/L,琼脂粉15 g/L;pH值6.5。

1.1.2.3 混合培养基:酵母粉8 g/L,氯化钠5 g/L,葡萄糖5 g/L,磷酸氢二钾2 g/L,碳酸钙5 g/L,吐温80(1 mL/L),硫酸镁0.5 g/L,pH值7.0。

1.1.3 试验仪器 pH计、立式压力蒸汽灭菌器、鼓风干燥箱、超净工作台、恒温培养箱、OXOID厌氧产气罐、涡旋混合仪等。

1.2 方法

1.2.1 菌种接种顺序及时间 酪酸梭菌单独培养时,在接种菌种7~9 h后开始产气,培养26~28 h时菌数和芽孢率均达到理想状态。粪肠球菌单独培养时无迟缓期,接种菌种后很快进入对数生长期,培养20~22 h后菌数达到最大值。根据以上生产经验,本试验分为4种组合,分别为:A:酪酸梭菌与粪肠球菌同时接种;B:酪酸梭菌培养6 h后接种粪肠球菌;C:酪酸梭菌培养8 h后接种粪肠球菌;D:酪酸梭菌培养10 h后接种粪肠球菌。分别对酪酸梭菌和粪肠球菌进行计数比较,并比较酪酸梭菌的芽孢率。

1.2.2 混合培养基主要成分的优化

1.2.2.1 葡萄糖 固定培养基中其他成分不变,改变葡萄糖浓度(0.2%、0.5%、0.8%、1.0%等4个梯度),根据酪酸梭菌和粪肠球菌活菌数确定葡萄糖最佳添加量。

1.2.2.2 酵母粉 固定培养基中其他成分不变,改变酵母粉浓度(0.2%、0.5%、0.8%、1.0%等4个梯度),根据酪酸梭菌和粪肠球菌活菌数确定酵母粉最佳添加量。

1.2.3 混合培养与单独培养比较 确定好混合培养基的配方与混合培养方案后,单独培养酪酸梭菌、单独培养粪肠球菌、混合培养酪酸梭菌和粪肠球菌,将单独培养和混合培养的酪酸梭菌和粪肠球菌分别计数,并进行比较。

2 结果与分析

2.1 菌种接种顺序及时间

因酪酸梭菌是芽孢菌,稳定期相对较长,而粪肠球菌在稳

收稿日期:2014-10-13

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2013381);江苏省盐城市农业科技创新专项引导资金(编号:YK2013045)。

作者简介:柴虹(1980—),女,硕士,助理研究员,从事微生物学研究。

Tel:(0515)88306077;E-mail:honghong6566@126.com。

定期后菌体衰亡较严重,故混合培养时间主要依据粪肠球菌培养时间来定。分别在混合培养 18、20、22 h 取样进行活菌计数,结果见表 1。由表 1 可以看出,同时接种酪酸梭菌菌种液与粪肠球菌菌种液,酪酸梭菌得不到充分的生长,酪酸梭菌培养 6 h 后接种粪肠球菌菌种液也是如此,酪酸梭菌培养

10 h 后接种粪肠球菌菌种液虽然酪酸梭菌数量较高,但酪酸梭菌芽孢率在后期相对于 C 组有所下降,同时粪肠球菌的数量也下降 1 个数量级,而酪酸梭菌培养 8 h 后接种粪肠球菌菌种液是最佳培养方案。

表 1 不同接种时间 2 种菌计数结果

混合培养 时间(h)	A 组			B 组			C 组			D 组		
	酪酸梭菌 (CFU/mL)	芽孢率(%)	粪肠球菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌 (CFU/mL)	芽孢率(%)	粪肠球菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌 (CFU/mL)	芽孢率(%)	粪肠球菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌 (CFU/mL)	芽孢率(%)	粪肠球菌 (CFU/mL)
18	6.8×10 ⁷	66.7	4.9×10 ⁸	6.4×10 ⁷	67.1	5.5×10 ⁸	1.8×10 ⁸	75.5	4.9×10 ⁸	2.0×10 ⁸	78.5	2.3×10 ⁷
20	7.3×10 ⁷	67.8	6.2×10 ⁸	8.1×10 ⁷	75.5	7.1×10 ⁸	2.3×10 ⁸	91.8	6.3×10 ⁸	2.3×10 ⁸	89.7	4×10 ⁷
22	8.2×10 ⁷	69.2	5.1×10 ⁸	8.9×10 ⁷	84.0	5.9×10 ⁸	2.2×10 ⁸	91.9	5.9×10 ⁸	2.5×10 ⁸	90.2	3.3×10 ⁷

2.2 混合培养基主要成分优化结果

2.2.1 葡萄糖 葡萄糖添加量分为 0.2%、0.5%、0.8% 和 1.0% 4 个梯度,培养基其他成分不变,酪酸梭菌培养 8 h 后接种粪肠球菌菌种液,混合培养 20 h 后采样进行 2 种菌活菌计数。结果显示,葡萄糖添加量在 0.2% 时菌数相对较少,0.5%、0.8%、1.0% 菌数差别不明显(表 2),最终确定葡萄糖添加量为 0.5%。

表 2 不同葡萄糖添加量 2 种菌计数结果

葡萄糖添加量 (%)	酪酸梭菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌芽孢率 (%)	粪肠球菌 (CFU/mL)
0.2	1.2×10 ⁸	83.2	3.9×10 ⁸
0.5	1.9×10 ⁸	91.0	6.1×10 ⁸
0.8	2.1×10 ⁸	90.8	5.8×10 ⁸
1.0	2.0×10 ⁸	89.9	6.3×10 ⁸

2.2.2 酵母粉 酵母粉添加量分为 0.2%、0.5%、0.8% 和 1.0% 四个梯度,培养基其它成分不变,酪酸梭菌培养 8h 后接种粪肠球菌菌种液,混合培养 20 h 后采样进行 2 种菌活菌计数。结果显示,酵母粉添加量在 0.2%、0.5% 时菌数相对较少,0.8%、1.0% 菌数差别不明显(表 3),最终确定酵母粉添加量为 0.8%。

表 3 不同酵母粉添加量 2 种菌计数结果

酵母粉添加量 (%)	酪酸梭菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌芽孢率 (%)	粪肠球菌 (CFU/mL)
0.20	1.2×10 ⁸	86.3	1.9×10 ⁸
0.50	1.4×10 ⁸	89.1	2.4×10 ⁸
0.80	2.1×10 ⁸	92.8	5.9×10 ⁸
1.00	2.2×10 ⁸	90.1	6.0×10 ⁸

2.2.3 混合培养与单独培养比较结果 由表 4 可见酪酸梭菌单独培养 26 h,活菌数 1.5×10⁸ CFU/mL,芽孢率 92.4%。粪肠球菌单独培养 20 h,活菌数 2.6×10⁸ CFU/mL。酪酸梭菌培养 8 h 接种粪肠球菌菌种液,混合培养 20 h,酪酸梭菌活菌数 2.2×10⁸ CFU/mL,芽孢率 91.2%,粪肠球菌 6.2×10⁸ CFU/mL。该结果显示,混合培养的酪酸梭菌活菌数比单独培养时稍高,芽孢率稍有下降;混合培养的粪肠球菌活菌数比单独培养时大幅增加,为单独培养时的 2.4 倍。

表 4 混合培养与单独培养 2 种菌计数结果

培养方式	酪酸梭菌 (CFU/mL)	酪酸梭菌芽孢率 (%)	粪肠球菌 (CFU/mL)
单独培养	1.5×10 ⁸	92.4	2.6×10 ⁸
混合培养	2.2×10 ⁸	91.2	6.2×10 ⁸

3 分析与结论

实验室范围内酪酸梭菌与粪肠球菌的单独培养工艺已经基本成熟。在此基础上,合理安排 2 种菌的接种顺序及接种时间,改善培养基中碳源、氮源的添加比例,最终达到高效混合培养 2 种菌的最终目的。因酪酸梭菌是芽孢菌,稳定期相对较长,而粪肠球菌在稳定期后菌体衰亡较严重,故混合培养时间主要依据粪肠球菌培养时间来定。试验结果表明,混合培养基中添加葡萄糖 0.5%,添加酵母粉 0.8%,酪酸梭菌接种混合培养基培养 8 h 后接种粪肠球菌,混合培养 20 h 后酪酸梭菌活菌数比单独培养时稍高,芽孢率稍有下降;混合培养的粪肠球菌活菌数比单独培养时大幅增加,为单独培养时的 2.4 倍。

参考文献:

[1] 谢树贵,戴青,赵述森,等. 丁酸梭菌对动物致病菌的拮抗作用研究[J]. 湖北农业科学,2007,46(3):424-426,435.
[2] 宋会议,吴天星. 酪酸菌微生态制剂的生物学功能及在饲料中的应用[J]. 饲料工业,2006,27(12):10-11.
[3] 余国莲,杜云平,梁健良,等. 丁酸梭菌培养条件优化[J]. 饲料广角,2013(5):31-32,50.
[4] 李妍,李拖平,孙勇勇. 培养条件对酪酸梭菌增殖生长的影响[J]. 食品工业科技,2013,34(18):217-221.
[5] 李妍,李拖平,孙勇勇. 酪酸梭菌制剂的开发及在农业生产中应用的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2013,328(9):63-65.
[6] 许光胜,王喜亮,吴涛,等. 猪源粪肠球菌的分离、鉴定及应用[J]. 中国兽医学报,2012,32(11):1645-1650.
[7] 王松丽,凌华云. 一种丁酸梭菌与鼠李糖乳杆菌的混合培养方法[J]. 武汉大学学报:理学版,2009,55(5):587-590.
[8] 吕存女,邝欣,张雪平,等. 酪酸梭菌与婴儿双歧杆菌对艰难梭菌体外生物拮抗作用的研究[J]. 中国微生态学杂志,2001,13(4):40-42.