

微生物菌群之间配比协调关系的研究

郭金玲¹, 李 炜², 郑秋红², 刘海奎³, 王国强⁴, 尹清强^{2*}

(1. 郑州牧业工程高等专科学校 畜牧工程系, 河南 郑州 450011; 2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 3. 河南省外贸粮油食品开封贸易实业公司, 河南 开封 475003; 4. 南阳农业学校, 河南 南阳 473000)

摘要: 对乳酸杆菌、乳酸球菌、枯草芽胞杆菌、酵母菌、大肠杆菌等菌种进行单独培养和不同比例的混合培养, 测定了发酵过程中 pH 值、活菌数量及光密度的变化情况。结果表明, 与含有 25% 混合菌液的发酵麸皮相比, 含 50% 混合菌液的发酵麸皮, 在发酵 24 h 后的需氧或厌氧活菌总数都有升高趋势($P > 0.05$), 发酵 1 周后其 pH 值的下降趋势明显($P < 0.05$), 说明乳酸菌数越多使 pH 下降越大。利用需氧(LB)和厌氧(MRS)培养液分别交叉培养需氧菌和厌氧菌, 均能在相应的培养基上生长。充分说明厌氧菌和需氧菌混合培养在理论上是可行的。但是, 如果用滤菌膜过滤后的培养过乳酸菌的 MRS 培养基来培养需氧菌时, 这些菌种均不能在滤液中生长。

关键词: 微生物; 混合发酵; pH 值; 光密度

中图分类号: Q938.1⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1004 3268(2007)09 0106 04

Study on the Proportion and Coordination of Microorganisms

GUO Jin ling¹, LI Wei², ZHENG Qiu hong²,

LIU Hai kui³, WANG Guo qiang⁴, YIN Qing qiang^{2*}

(1. Department of Animal Husbandry, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Henan Food and Oil Trade Company, Kaifeng 475003, China; 4. Nanyang Agricultural College, Nanyang 473000, China)

Abstract: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus subtilis*, *Yeast*, *E. coli* were pure cultured and co-cultured to determine their proportion and coordination by estimating the changes of pH value, viable count and optical density. The results indicated that the aerobic or anaerobic viable colonies were increased($P < 0.05$) in fermented wheat bran mixed with 50% bacterium culture after 24h fermentation, compared with that in the wheat bran containing 25% bacterium culture. Their pH values dropped down after a week fermentation($P < 0.05$). The aerobic and anaerobic bacteria could grow in aerobic (LB) and anaerobic (MRS) media, indicating that the mixed culture of aerobic and anaerobic bacteria was feasible theoretically. However, if the supernatant of *Lactobacillus* (passed through bacterium filter membrane to discard cell) was used to incubate aerobic bacteria, they could not grow.

Key words: Microorganisms; Mixed fermentation; pH value; Optical density

微生态制剂亦称益生菌、生菌剂、活菌制剂等, 主要用于调节动物机体微生态平衡。微生态制剂根

收稿日期: 2007 05 20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571346)

作者简介: 郭金玲(1964), 女, 河南南阳人, 副教授, 本科, 主要从事饲料教学与研究工作。

通讯作者: 尹清强(1964), 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要从事动物营养与生物工程研究。E-mail: QQZ22@yahoo.com.cn

据其所含微生物种类的不同又分为多种,应根据实际需要选择合适的制剂^[1]。如:为预防疾病应选择用乳酸菌、片球菌、双歧杆菌等产酸类细菌制成的微生态制剂;为促进生长、提高饲料利用率,可选择用芽孢杆菌、乳酸杆菌、酵母菌和霉菌等制成的微生态制剂^[2~4]。每种微生态制剂中,其菌群的混合配比情况,都应该是一种协调的关系。试验通过对菌种进行不同比例的混合培养和单独培养后,按照不同比例进行混合发酵,寻求复合菌制剂中各微生物菌群之间的配比协调关系。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

菌种主要为乳酸杆菌①、乳酸杆菌②、乳酸球菌、枯草杆菌 10619、产淀粉酶的枯草杆菌、酵母菌、消化乳杆菌、大肠杆菌、德亿 6 号等。LB 培养基, MRS 培养基, 麸皮。BCM-1000 型生物净化工作台, PHS-2C 数显酸度计, 电热恒温隔水培养箱, 电热恒温干燥箱, 可见分光光度计, 手提式压力蒸汽消毒器, 厌氧管, 锥形瓶。

1.2 试验方法

1.2.1 多种菌的单独培养及混合发酵和活菌数检测 在无菌条件下(超净工作台中), 分别接种乳酸杆菌①、乳酸杆菌②、乳酸球菌于 3 瓶 50 mL MRS 培养基中, 每种菌接种 0.1 mL, 置于 37℃ 恒温箱中培养 48 h。测定 pH 值, 乳酸杆菌①的 pH 值为 4.18, 乳酸杆菌②为 4.16, 乳酸球菌为 4.18。在无菌条件下, 分别接种 0.1 mL 的枯草杆菌 10619、产淀粉酶的枯草杆菌、酵母菌于 3 瓶 50 mL LB 培养基中, 置于 37℃ 水浴振荡器中培养 48 h。测其 pH 值, 枯草杆菌 10619 的 pH 值为 7.68, 产淀粉酶的枯草杆菌为 8.65, 酵母菌为 8.05。

在无菌条件下, 按总量 25% 的比例, 将上述培养的 6 种菌液以 1:1 的比例加入到经过高压的 145 g 麸皮中, 每种菌约加 6 mL; 混合均匀后装入 250 mL 锥形瓶中, 压实造成厌氧环境, 锡纸封口、封口膜固定, 置于 37℃ 恒温箱中进行发酵。

同样, 按总量 50% 的比例, 每种菌约 12 mL, 混合均匀后加入约 145 g 麸皮中; 压实封口后, 置于 37℃ 恒温箱中进行发酵, 发酵 1 周后测其 pH 值。分别取 25% 和 50% 的发酵麸皮各约 0.5 g 于 10 mL 的离心管中, 按照 10^3 , 10^5 , 10^6 , 10^7 的梯度用生理盐水对其进行稀释。分别取稀释后的各梯度溶液 0.1 mL, 接种到 LB 琼脂培养基和 MRS 琼脂培养

氧管中, 置于 37℃ 恒温箱中, 进行平板培养和厌氧管培养。24 h 后, 检查菌落数量。

1.2.2 需氧(LB)和厌氧(MRS)培养液交叉培养需氧菌与厌氧菌 在超净工作台上, 将 MRS 培养液培养的乳酸杆菌①、乳酸杆菌②、乳酸球菌分别接种 0.1 mL 到少量的 LB 培养基中, 置 37℃ 水浴恒温振荡培养。同样在超净工作台上, 分别接种 0.1 mL 枯草杆菌 10619, 产淀粉酶的枯草杆菌、酵母菌、白地霉于 MRS 培养基厌氧管中, 置于 37℃ 恒温箱中培养。

1.2.3 滤液培养 将 MRS 培养液培养的乳酸杆菌①、乳酸杆菌②、乳酸球菌菌液, 分别用滤菌膜过滤, 取其滤液。将 LB 培养液培养的枯草杆菌 10619 和德亿 6 号各 0.1 mL 接种到乳酸球菌的 MRS 培养基滤液中, LB 培养液培养的产淀粉酶的枯草杆菌接种 0.1 mL 到乳酸杆菌②的 MRS 培养基滤液中。置于 37℃ 恒温箱中进行培养。

用滤菌膜过滤 MRS 培养的乳酸杆菌菌液 50 mL, 在滤液中接种 100 μ L 大肠杆菌。另取 1 份滤液接种 50 μ L 大肠杆菌。另外, 接种 100 μ L 大肠杆菌到 MRS 培养基中。全部置于 37℃ 恒温箱中静置培养。

1.2.4 不同接种量的消化乳杆菌与枯草杆菌混合培养, 乳球菌与酵母菌混合培养。

编号 1: 取枯草杆菌 10 μ L, 消化乳杆菌 10 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 2: 取枯草杆菌 10 μ L, 消化乳杆菌 50 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 3: 取枯草杆菌 10 μ L, 消化乳杆菌 100 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 4: 取枯草杆菌 10 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 1*: 取酵母菌 10 μ L, 乳球菌 10 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 2*: 取酵母菌 10 μ L, 乳球菌 50 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 3*: 取酵母菌 10 μ L, 乳球菌 100 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中;

编号 4*: 取酵母菌 10 μ L, 接种到 50 mL 的 LB 培养基中。

将上述菌液置于 37℃ 恒温振荡培养, 分别测其光密度和 pH 值。分别取上述培养 48 h 的 8 种菌液, 每种 10 μ L, 置于 5 mL 离心管中。用生理盐水按 10^2 , 10^5 , 10^8 的梯度分别进行稀释。分别取稀释

后的 10^8 梯度的各菌液 0.1 mL, 接种到 LB 琼脂培养基上, 每种菌接种两个平板, 置于 37℃ 恒温箱中培养, 48 h 后检查菌落数量。

1.3 统计分析

用 SAS 8.0 软件分析其结果, 差异显著者用 $P<0.05$ 表示。

2 结果与分析

2.1 多种菌混合发酵 1 周后的 pH 测定值

多种菌混合发酵 1 周后的 pH 测定值见表 1。由表 1 可知, 发酵 1 周后, 与含 25% 混合菌液的麸皮发酵相比, 含 50% 混合菌液的麸皮的 pH 值下降

明显。说明乳酸菌数越多, pH 值下降越大。

表 1 含混合菌液的麸皮发酵 1 周后的 pH 值及微生物数量

项目	25%干	25%湿	50%干	50%湿
样品数	3	3	3	3
平均值	4.48±0.25 ^A	4.28±0.04 ^A	3.97±0.13 ^B	4.24±0.04 ^A

注: “干”为取出发酵麸皮后直接测量; “湿”为取出发酵麸皮后加 25 mL 蒸馏水后再测量。同行数据肩标字母不同者, 为差异显著($P<0.05$); 相同者为差异不显著($P>0.05$)

2.2 混合发酵麸皮中的活菌数检测结果

不同培养基上混合发酵麸皮中的活菌数, 其检测结果见表 2。

能在 LB 琼脂培养基上生长的为需氧的枯草杆

表 2 不同培养基上的菌落个数 (个/g)

项目	25%(LB)	50%(LB)	25%(MRS)	50%(MRS)
样品数	3	3	3	3
平均值	1.64E+09±1.32E+09 ^A	4.44E+09±3.77E+09 ^A	5.28E+08±3.67E+08 ^A	6.99E+08±4.96E+08 ^A

注: 同行数据肩标字母不同者, 为差异显著($P<0.05$); 相同者为差异不显著($P>0.05$)

菌 10619, 产淀粉酶的枯草杆菌和酵母菌; 在 MRS 琼脂培养厌氧管中生长的为厌氧的乳酸菌。由表 2 可知, 无论是对需氧的枯草杆菌 10619, 产淀粉酶的枯草杆菌和酵母菌, 还是厌氧的乳酸菌来说, 在麸皮中加入菌液的比例为 50% 时, 发酵 24 h 后的活菌总数均多于麸皮中加入的菌液比例为 25% 的麸皮中的活菌总数。这说明加入的菌液比例越大, 发酵后产生的活菌量越多。

2.3 LB 培养基培养乳酸菌及 MRS 培养基厌氧管培养需氧菌的结果

用 LB 培养基培养乳酸菌, 培养 48 h 后, 3 种乳酸菌均在 LB 培养基中生长。而用 MRS 培养基厌氧管培养 4 种需氧菌: 枯草杆菌 10619、产淀粉酶的枯草杆菌、酵母菌和白地霉, 在培养一段时间后, 4 种菌都有生长。其生长顺序为: 枯草杆菌 10619—酵母菌—产淀粉酶的枯草杆菌—白地霉。另外, 接种到 MRS 培养基中的大肠杆菌培养 24 h 后也有生长。培养过乳酸菌的 MRS 培养基用滤菌膜过滤后取的滤液, 接种其他菌种(包括枯草杆菌 10619、产淀粉酶的枯草杆菌、德亿 6 号、大肠杆菌)后培养, 这些菌种均不能在滤液中生长。

2.4 消化乳杆菌、枯草杆菌、乳球菌与酵母菌混合培养参数测定

pH 值随时间变化趋势见图 1。光密度随时间变化趋势见图 2。由图 1 可以看出, 在 72 h 之前, 各种菌液的 pH 值都有明显的上升趋势。培养 72 h 以后, 各种菌液 pH 值的变化逐渐趋于缓和, 平稳上

升。由图 2 可知, 在接种后到 24 h 之间, 特别是 12~24 h 时, 各种菌液的光密度均呈现明显的上升趋势, 由微生物的生长曲线可以推测出各菌体在这段时间处于生长迅速的对数生长期。在培养 24 h 后, 各种菌液的光密度值均达到最高, 即在 24 h 时各种菌液的细胞浓度都达到最大。24 h 后菌体的生长开始变慢, 光密度曲线逐渐呈现下降趋势, 细胞浓度开始降低。

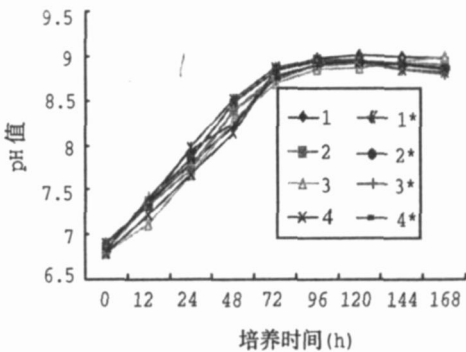


图 1 混合培养液中 pH 随时间变化

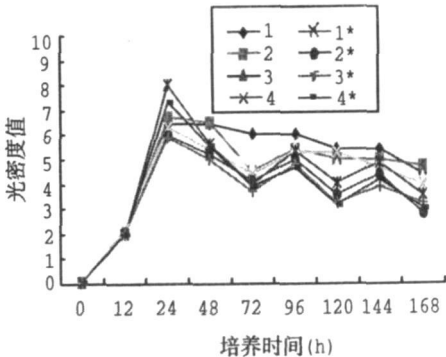


图 2 混合培养液中光密度随时间变化

2.5 消化乳杆菌与枯草杆菌及乳球菌与酵母菌混合培养 48 h 活菌检测结果

消化乳杆菌、枯草杆菌、乳球菌、酵母菌混合培养 48 h 后的活菌检测结果见表 3。从表 3 可知, 活菌量 1 号菌液中约为 2.0×10^{10} 个, 2 号为 7.0×10^{10} 个, 3 号为 2.0×10^{10} 个, 4 号为 2.4×10^{11} 个。1 * 菌液中活菌数约为 4.4×10^{11} 个, 2 * 为 4×10^{10} 个, 3 * 为 6×10^{10} 个, 4 * 为 7.5×10^{10} 个。2 号瓶(消化乳杆菌接种量为 $50 \mu\text{L}$, 枯草杆菌为 $10 \mu\text{L}$), 消化乳杆菌与枯草杆菌的接种量比例为 5 : 1, 菌液中的活菌量较多, 此种比例接种量最适合枯草杆菌和消化乳杆菌共同生长。但活菌数量比单独接种 $10 \mu\text{L}$ 的枯草杆菌的活菌数量要少。由此推测, 消化乳杆菌的生长与枯草杆菌的生长可能存在相互抑制作用。1 * 瓶(酵母菌接种量为 $10 \mu\text{L}$, 乳球菌为 $10 \mu\text{L}$), 酵母菌与乳球菌接种量比例为 1 : 1, 菌液中的活菌数量最多, 且活菌数量高于单独培养酵母菌的 4 * 瓶, 较适合酵母菌与乳球菌共同在 LB 培养基中生长。

表 3 混合培养 48 h 活菌检测结果

编号	样品数	平均值	编号	样品数	平均值
1 *	2	4.40E+11	1	2	2.00E+10
2 *	2	4.00E+10	2	2	7.00E+10
3 *	2	6.00E+10	3	2	2.00E+10
4 *	2	7.50E+10	4	2	2.40E+11

3 讨论

乳酸菌既可以在培养厌氧菌的 MRS 培养基上生长, 也可在培养需氧菌的 LB 培养基中生长。说明乳酸菌不是严格的完全厌氧。利用需氧(LB)和厌氧(MRS)培养液分别交叉培养需氧菌和厌氧菌, 各种菌都能在相应的培养基上生长, 充分说明厌氧菌和需氧菌混合培养在理论上是可行的。

而用滤菌膜过滤后的培养过乳酸菌的 MRS 培养基, 来培养其他菌种(枯草杆菌 10619、产淀粉酶的枯草杆菌、酵母菌、大肠杆菌)时, 这些菌种均不能在其滤液中生长。说明乳酸菌在生长过程中可能产生了某种物质, 而这种物质能够抑制其他菌生长^[5]。

在用混合菌液发酵的时候, 加入的菌液量愈多, 发酵后产生的活菌总数也愈多。与含有 25% 混合

菌液的发酵麸皮相比, 含 50% 混合菌液的发酵麸皮, 在发酵 24 h 后的需氧或厌氧活菌总数都有升高趋势($P > 0.05$)。而在发酵 1 周后其 pH 值的下降趋势明显($P < 0.05$), 这说明乳酸菌数越多 pH 下降越大。

不同比例的菌种混合培养, 其生长过程中的各参数变化也不同。在 72 h 之前, 各种菌液的 pH 值都呈明显的上升趋势。培养 72 h 以后, 各种菌液 pH 值的变化逐渐趋于缓和, 平稳上升。对于光密度, 在接种后到 24 h 之间, 特别是 12 h 到 24 h 时, 各种菌液的光密度均呈现明显的上升趋势, 由微生物的生长曲线可以推测出各菌体在这段时间处于生长迅速的对数生长期。在培养 24 h 后, 各种菌液的光密度值均达到最高, 也就是说在 24 h 时各种菌液的细胞浓度都达到最大。24 h 后, 光密度曲线逐渐呈现下降趋势, 细胞浓度开始降低, 说明菌体生长的速度开始变慢, 这一结果与曹卫军等^[9]的研究结果一致。根据消化乳杆菌与枯草杆菌及乳球菌与酵母菌混合培养 48 h 活菌检测结果可知, 当消化乳杆菌与枯草杆菌的接种量比例为 5 : 1 时, 菌液中的活菌量较多, 此种比例接种量最适合枯草杆菌和消化乳杆菌共同生长。而酵母菌与乳球菌接种量比例为 1 : 1 时, 菌液中的活菌数量最多, 且活菌数量高于单独培养酵母的活菌数量。

参考文献:

[1] 张媛, 毛玉杰. 乳酸杆菌及其在微生态制剂中的作用 [J]. 辽宁畜牧兽医, 2004(2): 42 - 44.

[2] 左勇, 刘清斌. 饲用活菌制剂生长特性的研究 [J]. 四川食品与发酵, 2005(3): 37 - 40.

[3] 向渐升, 李文平. 益生菌的作用机理及其影响因素 [J]. 湖北畜牧兽医, 2006(11): 37 - 38.

[4] 孔海英, 孟宪梅. 动物微生态制剂的研究进展及发展应用前景 [J]. 吉林粮食高等专科学校学报, 2006(3): 4 - 7.

[5] 黄沧海, 谯仕彦, 李德发. 益生乳酸杆菌抑制大肠杆菌的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2003(6): 27 - 28.

[6] 曹卫军, 马辉文. 生物工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 91 - 141.