DOI:10.12441/spyswjs.20230131005 [文章编号] 1673-1689(2025)03-0066-09

卷曲乳杆菌与格氏乳杆菌选择性计数培养基的设计及共培养研究

王玉欣 毛丙永 唐 鑫 赵建新 张秋香* 崔树茂

(江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】解析卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)CCFM1298与格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)CCFM1201在共培养体系中的相互作用,为开发多菌株益生菌制剂提供理论依据。**【方法】**通过设计选择性计数培养基,观察共培养体系中2株益生菌活菌数的变化,基于该结果解析2株益生菌的相互作用。**【结果】**将培养基渗透压改变为1 600 mOsmol/kg,能够实现共培养体系中2株益生菌的有效分离及准确计数。无论以何种初始比例接种,在MRS液体培养基中混合培养后,格氏乳杆菌CCFM1201总是优势菌,原因是格氏乳杆菌CCFM1201的代时显著小于卷曲乳杆菌CCFM1298(P<0.01)。以平衡代时为目标,发现低聚果糖能够有效缓解2株益生菌之间的营养生态位竞争,避免生长不平衡现象。**【结论】**该研究初步揭示了2株益生菌之间的相互作用和有效缓解生长不平衡问题的方法,为后续多菌株益生菌制剂的理性设计与功能优化提供了新策略。

关键词:多菌株益生菌;选择性计数培养基;共培养;相互作用;营养生态位竞争

Selective Counting Medium Design and Co-culture of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri*

*WANG Yuxin MAO Bingyong TANG Xin ZHAO Jianxin ZHANG Qiuxiang** *CUI Shumao*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to elucidate the interactions between *Lactobacillus crispatus* CCFM1298 and *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 in a co-culture system, thereby providing a theoretical basis for the development of multi-strain probiotic preparations. [**Method**] By the design of selective counting medium, the viable cell counts of the two probiotic strains in the co-culture system were monitored, and the interactions of the two strains were elucidated based on the results. [**Result**] Adjusting the osmotic pressure of the medium to 1 600 mOsmol/kg enabled effective isolation and accurate counting of the two probiotic strains in the co-culture system. Regardless of the initial inoculation ratio, after co-culture in the MRS broth, *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 always emerged as the dominant strain, which was attributed to its shorter generation time than that of *Lactobacillus crispatus* CCFM1298 (P<0.01). The experiment aiming to balance the generation time showed that fructooligosaccharides effectively alleviated the competition for nutrient niches between the two strains, thereby preventing imbalanced growth. [**Conclusion**] The study preliminarily reveals the interaction between the two probiotic strains and the method to effectively mitigate the imbalanced growth. The findings provide new strategies for the rational design and functional optimization of subsequent multi-strain probiotic preparations.

Keywords: multi-strain probiotics; selective counting medium; co-culture; interaction; competition for nutrient niches

---

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32072197)。

通信作者:张秋香(1979—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事益生菌理论与技术、特殊生境益生菌功能发掘、口腔微生态与健康研究。E-mail:zhangqx@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-01-31 **修回日期:**2023-02-26

益生菌是一类足量食用时具有健康益处的活微生物[1]，能够预防或治疗多种健康问题，如：改善肠易激综合征（irritable bowel syndrome，IBS）[2]，预防或治疗龋齿、口臭及牙周炎[3]，缓解细菌性阴道炎与念珠菌性阴道炎[4]，预防或治疗皮肤病等[5]。

益生菌产品分为单菌株制剂和多菌株制剂。与单菌株益生菌制剂不同，多菌株益生菌由同属或不同属的多种菌株复配而成。研究表明，某些情况下，多菌株制剂可能比单菌株制剂更有效[6]。例如，Frech等[7]评估了含有双歧杆菌、乳杆菌及链球菌的多菌株益生菌的功能，发现能够显著改善IBS指标，如腹痛、腹胀，并改善IBS患者肠道菌群的组成；多菌株益生菌VSL#3由8种菌株组成，是一种高浓度（4 500亿活菌/袋）益生菌制剂，美国及英国的治疗指南将VSL#3作为慢性贮袋炎患者预防贮袋炎复发的选择[8]。

然而，多菌株益生菌并非多种菌株间的简单混合，这些菌株间可能存在竞争抑制作用，如产生抗菌物质或争夺胃肠道内的营养及黏附位点等[9]。例如，Diep等[10]将旧金山乳杆菌DPPMA174、戊糖片球菌2XA3与植物乳杆菌DC400共培养，旧金山乳杆菌DPPMA174与戊糖片球菌2XA3的生长受到明显抑制。这可能由于共培养时植物乳杆菌DC400合成的信息素PlnA的水平发生变化，进而对旧金山乳杆菌DPPMA174与戊糖片球菌2XA3造成了胁迫[11]。因此，有必要研究菌株间的相互作用，以确定多菌株益生菌制剂中不同菌株的最佳组合[12]。

作者所在课题组前期从健康女性阴道中筛选到1株卷曲乳杆菌CCFM1298及1株格氏乳杆菌CCFM1201，动物试验表明这2株菌能够分别有效缓解细菌性阴道炎[13]及念珠菌性阴道炎[14]。作者通过设计选择性计数培养基，在体外共培养体系中观察2株菌的相互作用，为了解菌株间相互作用以及后续开发多菌株益生菌制剂提供理论参考和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

卷曲乳杆菌CCFM1298和格氏乳杆菌CCFM1201分离自健康女性阴道分泌物；质控菌株干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）ATCC334：美国典型菌种保藏中心。菌株现均保藏于江南大学食品学院生物技术研究中心菌种库。

1.1.2 试剂

MRS培养基所需试剂、氯化钠、乳糖、*D*-蜜二糖、*D*-海藻糖、麦芽糖、甘露糖：国药集团化学试剂有限公司；硫酸庆大霉素、硫酸链霉素、硫酸新霉素、氯霉素：上海生工生物工程股份有限公司；棉子糖、红霉素：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；低聚果糖、低聚半乳糖：量子高科（广东）生物有限公司；低聚木糖、低聚甘露糖、菊粉、抗性糊精、低聚异麦芽糖：上海源叶生物科技有限公司；ISO-SENSITEST BROTH（OXOID）：上海创赛科技有限公司。

1.1.3 培养基

1）MRS液体培养基：蛋白胨10.0 g/L，牛肉膏10.0 g/L，酵母提取物5.0 g/L，葡萄糖20.0 g/L，无水乙酸钠2.0 g/L，三水合磷酸氢二钾2.6 g/L，柠檬酸氢二铵2.0 g/L，一水合硫酸锰0.25 g/L，七水合硫酸镁0.5 g/L，吐温-80 1 mL，将pH调至6.2~6.4，115 ℃灭菌20 min。

2）MRS固体培养基：在配制好的MRS液体培养基中加入15~20 g/L的琼脂粉，115 ℃灭菌20 min。

3）LSM培养基：按1∶9的体积比将MRS液体培养基与ISO-SENSITEST BROTH培养基混合。

4）MRS-N培养基[15]：在MRS液体培养基中添加NaCl调节渗透压，每100 mL液体培养基添加0.3 g NaCl，渗透压平均增长100 mOsmol/kg（采用渗透活性物质的质量摩尔浓度表示渗透压）。

1.2 仪器与设备

小型台式高速离心机：5424R型，德国Eppendorf公司；超净工作台：SW-CJ-1CV型，苏州安泰空气技术有限公司；高温高压灭菌锅：MLS-3750型，日本SANYO公司；隔水式恒温培养箱：GPR-9160型，上海森信实验仪器有限公司；紫外分光光度计：UV2450型，日本岛津公司；电子天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 碳源利用能力测定

1）碳源选择：查阅《伯杰氏系统细菌学手册》，根据卷曲乳杆菌与格氏乳杆菌的碳源利用能力，选择代谢有差异的碳源：乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、棉子糖、海藻糖。

2）测定方法：将MRS液体培养基中的葡萄糖分别等量替换为上述碳源，灭菌备用。参照张程程[16]的方法，测定2株益生菌在上述6种糖中的生长情况。

1.3.2 抗生素对2株益生菌的最小抑菌浓度测定

参考国际标准ISO 10932:2010[17]，使用肉汤稀释法测定5种抗生素对卷曲乳杆菌CCFM1298及格氏乳杆菌CCFM1201的最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）。采用二倍梯度稀释法，配制不同质量浓度的抗生素稀释液。在无菌96孔板中，按照低质量浓度到高质量浓度将抗生素稀释液从第2孔依次添加至第11孔，每孔添加100 μL。每行第1孔为空白培养基对照，第12孔不加抗生素作为生长对照。将稀释后的菌悬液（10^5~10^6 CFU/mL）添加至第2到第12孔，每孔100 μL，干酪乳杆菌ATCC334作为质控菌株。密封后置于37 ℃恒温培养箱孵育48 h，肉眼观察不到可见生长菌的最低抗生素质量浓度即为MIC。同一抗生素质量浓度做3个平行，3次独立重复试验，最终确定5种抗生素对2株益生菌的MIC值。

1.3.3 具有选择性的红霉素质量浓度筛选及格氏乳杆菌CCFM1201的实际回收率测定

配制含不同质量浓度红霉素（0、0.128、0.256、0.512、1.024、2.048 μg/mL）的MRS固体培养基，将卷曲乳杆菌CCFM1298于上述培养基中进行平板菌落计数，置于37 ℃恒温培养箱孵育48 h，确定具有选择性的红霉素质量浓度。

确定红霉素质量浓度后，将格氏乳杆菌CCFM1201分别置于MRS固体培养基、选择性计数培养基中进行平板菌落计数，37 ℃恒温培养箱孵育48 h，按式（1）计算格氏乳杆菌CCFM1201的实际回收率[18]。

$$R=\frac{A_1}{A_2}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

R——实际回收率，%；

A_1——格氏乳杆菌CCFM1201在选择性计数培养基中的活菌数，CFU/mL；

A_2——格氏乳杆菌CCFM1201在MRS培养基中的活菌数，CFU/mL。

1.3.4 盐胁迫耐受性测定

参照张莹[15]的方法测定盐胁迫耐受性。MRS液体培养基的初始渗透压为300 mOsmol/kg。在MRS液体培养基中添加NaCl使初始渗透压分别为1 400、1 500、1 600、1 700、1 800、1 900、2 000 mOsmol/kg，调节pH至6.2~6.4，115 ℃灭菌20 min。以2%的体积分数将活化后的卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201分别接种至不同渗透压的MRS液体培养基中，37 ℃恒温培养箱孵育24 h，观察2株益生菌的生长情况。同一渗透压做3个平行，3次独立重复试验。

1.3.5 渗透压为1 600 mOsmol/kg时培养基的选择性及格氏乳杆菌CCFM1201的实际回收率测定

配制MRS固体培养基、渗透压为1 600 mOsmol/kg的MRS固体培养基，将卷曲乳杆菌CCFM1298、格氏乳杆菌CCFM1201分别于上述培养基中进行平板菌落计数，置于37 ℃恒温培养箱孵育96 h，确定渗透压为1 600 mOsmol/kg时培养基的选择性以及格氏乳杆菌CCFM1201的实际回收率，实际回收率按式（1）计算。

1.3.6 选择性计数培养基验证

将卷曲乳杆菌CCFM1298、格氏乳杆菌CCFM1201分别置于MRS固体培养基进行平板菌落计数，记录初始菌数。将2株菌的菌悬液以体积比1∶1混合，置于MRS固体培养基以及选择性计数培养基分别计数，通过计算2株益生菌的检出率，验证选择性计数培养基的有效性及可行性。检出率按式（2）计算。

$$D=\frac{X_1}{X_2}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

D——检出率，%；

X_1——混合体系中格氏乳杆菌CCFM1201的活菌数，CFU/mL；

X_2——混合前格氏乳杆菌CCFM1201的活菌数，CFU/mL。

1.3.7 格氏乳杆菌CCFM1201抗菌试验

卷曲乳杆菌CCFM1298菌悬液、格氏乳杆菌CCFM1201的无细胞上清液及菌悬液制备：将2株益生菌活化3代得到菌悬液；将格氏乳杆菌CCFM1201菌悬液在4 ℃、15 000 *g*离心1 min，取上清液，经0.22 μm滤膜过滤得到无细胞上清液。

双层琼脂抗菌试验，参考Özçam等[19]的研究并稍加修改：使用含卷曲乳杆菌CCFM1298的双

层琼脂对格氏乳杆菌CCFM1201的无细胞上清液及菌悬液进行抗菌作用测定。

1.3.8　2株益生菌于MRS和MRS-低聚果糖液体培养基以不同比例共培养

参照Weiss等[20]的研究，并稍加修改：将活化2代后的卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201分别以体积比1∶1、9∶1、1∶9混合于MRS液体培养基共培养，测定2株益生菌的初始菌数（0 h）。如上所述进行72 h的益生菌生长测定，每24 h测定共培养物中2株菌的活菌数，并将共培养物以体积分数2%接种至新鲜的MRS液体培养基中继续培养。

将MRS液体培养基中的葡萄糖等量替换为低聚果糖，以MRS培养基为对照，其余方法同上。

1.3.9　不同碳源下代时的测定

将活化后的卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201以体积分数2%接种至MRS液体培养基以及不同碳源（低聚果糖、低聚木糖、低聚甘露糖、菊粉、抗性糊精、低聚半乳糖）代替葡萄糖后的MRS液体培养基中，同一碳源一式三份，每2 h取3份样品测定OD_{600}值。

参考高欣伟[21]的方法，以生长时间为横坐标，lb（OD_{600}值）为纵坐标，分别绘制2株益生菌在不同碳源下的生长曲线，并根据生长曲线判断对数生长期。将对数生长期的时间作为自变量，对应的OD_{600}值为因变量，根据式（3）计算生长代时。

$$G=\frac{t}{\mathrm{lb}\,O_2-\mathrm{lb}\,O_1} \tag{3}$$

式中：

G——代时，h；

t——生长时间，h；

O_1——进入对数期时的OD_{600}值；

O_2——t时刻的OD_{600}值。

1.4　数据分析

所有数据使用SPSS Statistics 26.0进行单因素方差分析（one-way ANOVA），以独立样本t检验进行数据差异显著性分析，结果以平均值±标准差表示，$P<0.05$认为具有显著性差异，采用GraphPad Prism 8.0对数据进行可视化。

2　结果与讨论

2.1　选择性计数培养基的设计

共培养体系中，微生物之间可能存在协同代谢、干扰竞争、诱导代谢等相互作用，对共培养体系中微生物数量产生影响[22]。为探究卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201在体外共培养时的相互作用，必须明确共培养体系中2株益生菌的数量。

普通的MRS培养基仅能够得到共培养物的总数，无法区分卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201，因此必须设计选择性计数培养基。选择性计数培养基通常是根据微生物的特殊营养需求或对某些化学、物理因素的抗性而设计的培养基，使用较多的是抗生素、无机盐、碳源、酸、胆汁等成分[23]。作者根据碳源利用能力、抗生素耐受性及渗透压胁迫耐受性的差异设计选择性计数培养基，为探究2株菌之间的相互作用提供定量工具。

2.1.1　碳源的筛选

根据《伯杰氏系统细菌学手册》，找出卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201在碳水化合物利用能力方面存在差异的碳源。检测的碳源包括乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、棉子糖、海藻糖。观察2株益生菌在上述碳源中的生长情况，结果显示，卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201均可以利用6种碳源，因此无法通过改变碳源区分2株益生菌。

2.1.2　抗生素的筛选

鉴于2株益生菌在不同碳源中生长情况无差异，作者考虑利用它们对抗生素耐受性的差异来区分。研究表明，乳杆菌属一般对能够抑制蛋白质合成的抗生素比较敏感，其中红霉素、氯霉素、克林霉素、四环素以及氨基糖苷类抗生素（如链霉素、新霉素、庆大霉素）均属于蛋白质合成抑制剂[24-25]。作者通过测定5种抗生素（硫酸庆大霉素、硫酸链霉素、硫酸新霉素、氯霉素以及红霉素）对2株益生菌的MIC值，寻找具有选择性的抗生素及适用质量浓度。

结果如表1所示，除氯霉素对2株益生菌的MIC值相同外，其余4种抗生素对2株益生菌的MIC值均有差异。其中硫酸庆大霉素、硫酸链霉素以及硫酸新霉素对2株益生菌的MIC值均相差7倍，红霉素则相差127倍。因此，卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201对红霉素的耐受程度差异较大，表明红霉素更可能选择性抑制卷曲乳杆菌CCFM1298的生长，进而区分2株益生菌。

表 1　5 种抗生素对 2 株益生菌的 MIC 值

Table 1　MIC values of five antibiotics against two strains of probiotics

单位：μg/mL

菌株	MIC 值				
	硫酸庆大霉素	硫酸链霉素	硫酸新霉素	氯霉素	红霉素
卷曲乳杆菌 CCFM1298	12.8	40	81.92	8	0.064
格氏乳杆菌 CCFM1201	1.6	5	10.24	8	8.192

2.1.3　不同质量浓度红霉素对 2 株益生菌的选择能力及格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率

为确定完全抑制卷曲乳杆菌 CCFM1298 生长的红霉素质量浓度，将过夜培养的卷曲乳杆菌 CCFM1298 分别稀释 10^2 倍、10^3 倍、10^4 倍、10^5 倍、10^6 倍，涂布于含不同质量浓度红霉素的 MRS 固体培养基，以完全无菌落生长为标准进行判断，MRS 固体培养基作为阴性对照。如表 2 所示，红霉素的质量浓度为 0.512 μg/mL 及以上时，卷曲乳杆菌 CCFM1298 在所有稀释度均未检出，表明这 3 种质量浓度为合适的选择质量浓度。

在 MRS 固体培养基中分别添加 0.512、1.024、2.048 μg/mL 红霉素，测定在该抗生素不同质量浓度下格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率，以判断格氏乳杆菌计数的准确性。结果如图 1 所示，0.512、1.024、2.048 μg/mL 的红霉素对格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率分别为 84.97%、76.40%、71.27%，误差均大于 10%，超出平板菌落计数的正常误差[23]。因此，上述培养基无法实现对格氏乳杆菌 CCFM1201 的准确计数。

2.1.4　渗透压的筛选

由于添加抗生素未实现准确计数，作者考虑通过改变培养基的渗透压实现混合培养时 2 株益生菌的准确计数。观察 2 株益生菌在不同渗透压下的生长状况，寻找有明显差异的渗透压，以 MRS 液体培养基作为对照。结果如表 3 所示，当渗透压为 1 600 mOsmol/kg 时，卷曲乳杆菌 CCFM1298 生长状况受到明显抑制，此时格氏乳杆菌 CCFM1201 的生长未受到影响。

2.1.5　渗透压为 1 600 mOsmol/kg 时培养基的选择性及格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率

将培养基渗透压调整为 1 600 mOsmol/kg，卷曲乳杆菌 CCFM1298 稀释 10^2 倍、10^3 倍、10^4 倍、10^5 倍、10^6 倍时均未检出，表明该培养基具有较好的选择性。测定格氏乳杆菌 CCFM1201 在该培养基下的实际回收率，以评估该培养基的计数准确性，结果如图 2 所示，格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率为 98.37%，误差小于 10%，属于平板菌落计数的正常误差。

表 2　不同质量浓度的红霉素选择能力的测定

Table 2　Selectivity of different mass concentrations of erythromycin

红霉素质量浓度/（μg/mL）	不同稀释倍数下卷曲乳杆菌 CCFM1298 的生长情况				
	10^2 倍	10^3 倍	10^4 倍	10^5 倍	10^6 倍
0	（+）	（+）	（+）	（+）	（+）
0.128	（+）	（+）	（+）	（+）	（+）
0.256	（+）	（+）	（+）	（+）	（+）
0.512	（−）	（−）	（−）	（−）	（−）
1.024	（−）	（−）	（−）	（−）	（−）
2.048	（−）	（−）	（−）	（−）	（−）

注：“（+）”表示阳性；“（−）”表示阴性。

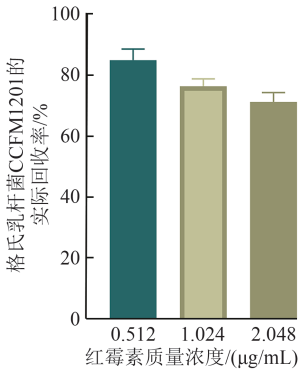


图 1　不同质量浓度的红霉素条件下格氏乳杆菌 CCFM1201 的实际回收率

Fig. 1　Actual recovery of *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 by different mass concentrations of erythromycin

表 3　2 株益生菌渗透压胁迫耐受性测定

Table 3　Salt stress tolerance of two strains of probiotics

渗透压（mOsmol/kg）	菌株的生长情况	
	卷曲乳杆菌 CCFM1298	格氏乳杆菌 CCFM1201
300	+	+
1 400	±	+
1 500	±	+
1 600	−	+
1 700	−	±
1 800	−	±
1 900	−	−
2 000	−	−

注：“+”表示生长未受影响；“±”表示生长受影响；“−”表示生长受到明显抑制。

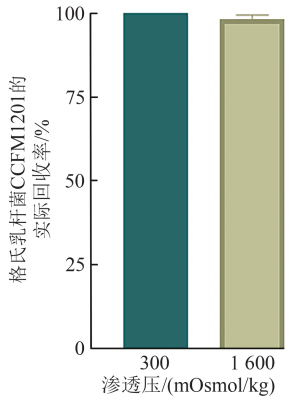


图2　渗透压为1 600 mOsmol/kg的培养基中格氏乳杆菌CCFM1201的实际回收率

Fig. 2　Actual recovery of *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 in the medium with the osmotic pressure of 1 600 mOsmol/kg

2.1.6　选择性的验证

为验证该选择性计数培养基的有效性及可行性，使用MRS固体培养基分别测定2株益生菌的初始菌数，同时使用MRS固体培养基、选择性计数培养基分别测定混合体系中的总菌数及2株益生菌的活菌数。通过计算2株益生菌的检出率，判断选择性计数培养基的有效性及可行性。

结果如表4所示，在两种计数培养基体系中，卷曲乳杆菌CCFM1298和格氏乳杆菌CCFM1201的活菌数与检出效率呈现出高度一致性的特征，误差均在10%以内，属于平板菌落计数的正常误差，说明该选择性计数培养基能够有效分离2株益生菌且能够实现准确计数。

综上所述，将MRS液体培养基的渗透压改变至1 600 mOsmol/kg能够实现卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201的有效分离及准确计数。因此，后续研究将以该选择性计数培养基作为定量工具，探究2株益生菌共培养时的相互作用。

表4　选择性计数培养基验证结果

Table 4　Validation results of selective counting medium

	初始菌数/lg（CFU/mL）	测量菌数/lg（CFU/mL）	检出率/%
卷曲乳杆菌CCFM1298	8.29±0.01	8.27±0.02[a]	99.73±0.25
格氏乳杆菌CCFM1201	7.62±0.03	7.63±0.03	100.00±0.31
总菌（MRS）	8.38±0.01	8.36±0.01	99.80±0.17

注：a为计算值，由总菌（MRS）的测量菌数减去格氏乳杆菌CCFM1201的测量菌数得到。

2.2　卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201共培养

群落结构可能受到初始物种丰度的影响[26]，故检测卷曲乳杆菌CCFM1298和格氏乳杆菌CCFM1201按不同比例共培养时，两者的相对丰度情况。结果如图3所示，无论卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201初始接种体积比为1∶1、9∶1还是1∶9，共培养72 h后，混合体系中优势菌均为格氏乳杆菌CCFM1201，表明格氏乳杆菌CCFM1201在共培养体系中具有竞争优势。共培养体系中微生物之间会存在干扰竞争，这种相互作用在微生物群落的组成以及维持中非常重要[27]。其中抗菌化合物的生成在干扰竞争中扮演重要角色[28]。Özçam等[19]发现肠道共生菌罗伊氏乳杆菌R2lc产生PKs（聚酮合酶）进而介导AhR（芳烃受体）活化，最终导致宿主产生抗菌肽，抑制罗伊氏乳杆菌100-23的生长。因此，推测格氏乳杆菌CCFM1201可能通过产生次级代谢物抑制卷曲乳杆菌CCFM1298的生长。

2.3　格氏乳杆菌CCFM1201对卷曲乳杆菌CCFM1298抗菌作用的测定

为探究格氏乳杆菌CCFM1201是否通过分泌抗菌物质为其提供竞争优势，分别测定格氏乳杆菌CCFM1201活菌及无细胞上清液对卷曲乳杆菌CCFM1298的抑菌作用。

结果表明，格氏乳杆菌CCFM1201的活菌、无细胞上清液均未对卷曲乳杆菌CCFM1298产生抑制作用，表明格氏乳杆菌CCFM1201具备竞争优势并非因为产生抗菌物质。

根据竞争相关性假说，两个生物体的关系越密切越有可能由于重叠的生态位而相互竞争和排斥[29]。生殖道中的α-淀粉酶将糖原分解为较小的碳水化合物（如麦芽糖、麦芽三糖、麦芽五糖和麦芽糊精），为阴道中的乳杆菌提供能量[30]。卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201均来源于阴道，推测也可能由于格氏乳杆菌CCFM1201竞争碳水化合物的能力优于卷曲乳杆菌CCFM1298，导致格氏乳杆菌CCFM1201能够快速增殖成为优势菌。

2.4　卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌CCFM1201利用葡萄糖的代时

为比较卷曲乳杆菌CCFM1298与格氏乳杆菌

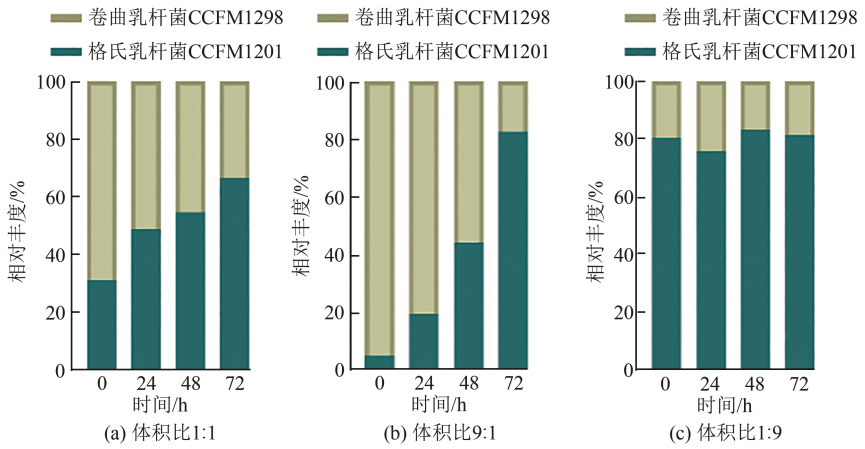
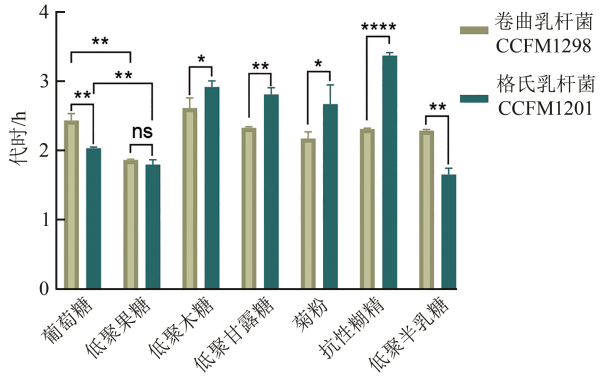


图 3 卷曲乳杆菌 CCFM1298 和格氏乳杆菌 CCFM1201 按不同比例共培养时两者相对丰度变化

Fig. 3 Changes in relative abundance of *Lactobacillus crispatus* CCFM1298 and *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 co-cultured in different volume ratios

CCFM1201 利用碳水化合物的能力差异，测定 2 株益生菌在以葡萄糖为碳源的 MRS 液体培养基中的代时。结果如图 4 所示，以葡萄糖为碳源时，格氏乳杆菌 CCFM1201 代时较短，为（2.03±0.16）h。卷曲乳杆菌 CCFM1298 利用葡萄糖代时稍长，为（2.43±0.10）h，两者之间具有显著性差异（P<0.01）。这表明以葡萄糖为碳源时，格氏乳杆菌 CCFM1201 的平均生长速率大于卷曲乳杆菌 CCFM1298，能够优先竞争碳水化合物，与混合体系中格氏乳杆菌 CCFM1201 总是成为优势菌这一趋势相对应。

研究表明，物种单一培养时的生长速率与其平均竞争能力相关[31]。Deines 等[32]发现，*Duganella* 与 *Curvibacter* 在有搅拌和无搅拌的悬浮共培养环境中，无论试验的接种比例如何，具有较快生长速度的 *Duganella* 在指数生长期均为优势菌。Li 等[33]在体外环境中也观察到了类似现象。



*—P<0.05；**—P<0.01；****—P<0.000 1；ns—P>0.05。

图 4 卷曲乳杆菌 CCFM1298 和格氏乳杆菌 CCFM1201 利用不同碳源的代时差异

Fig. 4 Generation time differences between *Lactobacillus crispatus* CCFM1298 and *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 with different carbon sources

2.5 卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 利用不同低聚糖的代时

为避免共培养体系中卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 的营养生态位竞争，测定 2 株益生菌利用不同低聚糖的代时，寻找能够平衡代时的低聚糖。结果如图 4 所示，卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 利用低聚果糖的代时分别为（1.86±0.01）h 和（1.79±0.07）h，无显著性差异，且与利用葡萄糖的代时相比显著降低（P<0.01）。除低聚果糖外，2 株益生菌利用其他 5 种低聚糖的代时均有显著差异。

2.6 低聚果糖对卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 共培养的影响

为探究低聚果糖是否会影响卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 共培养时群落组成结构，将 MRS 液体培养基中的葡萄糖等量替换为低聚果糖，测定 2 株菌以不同接种比例共培养 72 h 后的群落组成，以 MRS 液体培养基为对照。

当碳源为葡萄糖时，72 h 时格氏乳杆菌 CCFM1201 始终为优势菌，与初始接种比例无关，见图 3；将碳源替换为低聚果糖后，初始相对丰度较高的菌株 72 h 后仍为优势菌，见图 5。这表明，低聚果糖能有效缓解卷曲乳杆菌 CCFM1298 与格氏乳杆菌 CCFM1201 之间的营养生态位竞争，促进卷曲乳杆菌 CCFM1298 的生长，避免了生长不平衡现象的发生。

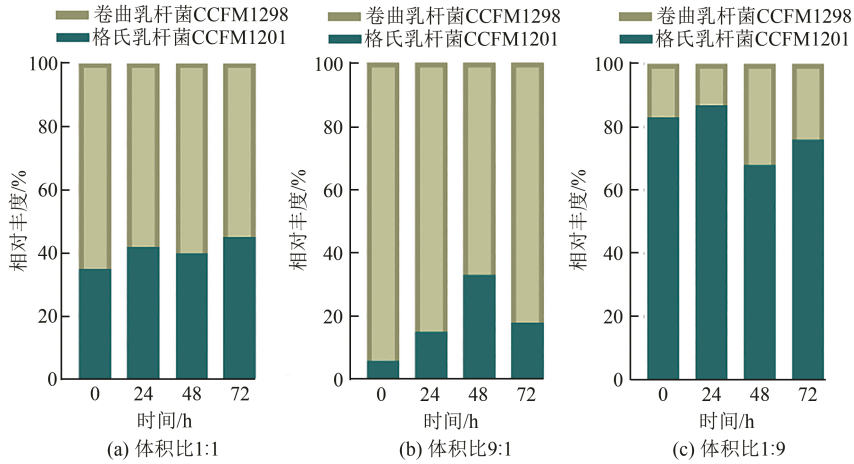


图5　低聚果糖对卷曲乳杆菌CCFM1298和格氏乳杆菌CCFM1201按不同体积比共培养时群落组成的影响

Fig. 5　Effect of fructooligosaccharides on the community composition of *Lactobacillus crispatus* CCFM1298 and *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 co-cultured in different volume ratios

3　结论

该研究通过将培养基渗透压改变为1 600 mOsmol/kg，实现共培养体系中2株益生菌的有效分离及准确计数。基于选择性计数培养基，发现无论以何种初始接种比例在MRS液体培养基中混合培养后，格氏乳杆菌CCFM1201总是优势菌，其本质原因是格氏乳杆菌CCFM1201的代时显著小于卷曲乳杆菌CCFM1298（P<0.01）。以平衡代时为目标，发现将碳源替换为低聚果糖能有效缓解2株益生菌之间的营养生态位竞争，避免生长不平衡现象。该研究初步揭示了2株益生菌之间的相互作用和有效缓解生长不平衡问题的方法，为后续开发多菌株益生菌制剂提供理论参考和依据。

参考文献

[1] HILL C，GUARNER F，REID G，et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology，2014，11：506-514.

[2] FORD A C，QUIGLEY E M M，LACY B E，et al. Efficacy of prebiotics，probiotics，and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation：systematic review and meta-analysis[J]. The American Journal of Gastroenterology，2014，109(10)：1547-1561.

[3] BUSTAMANTE M，OOMAH B D，MOSI-ROA Y，et al. Probiotics as an adjunct therapy for the treatment of halitosis，dental caries and periodontitis[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins，2020，12(2)：325-334.

[4] CHEE W J Y，CHEW S Y，THAN L T L. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health[J]. Microbial Cell Factories，2020，19(1)：203.

[5] SANDERS M E，MERENSTEIN D J，REID G，et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease：from biology to the clinic[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology，2019，16：605-616.

[6] KWOJI I D，AIYEGORO O A，OKPEKU M，et al. Multi-strain probiotics：synergy among isolates enhances biological activities[J]. Biology，2021，10(4)：322.

[7] FRECH T M，KHANNA D，MARANIAN P，et al. Probiotics for the treatment of systemic sclerosis-associated gastrointestinal bloating/distention[J]. Clinical and Experimental Rheumatology，2011，29(Suppl. 65)：S22-S25.

[8] CHAPMAN T M，PLOSKER G L，FIGGITT D P. VSL#3 probiotic mixture：a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases[J]. Drugs，2006，66(10)：1371-1387.

[9] CHAPMAN C M C，GIBSON G R，ROWLAND I. Health benefits of probiotics：are mixtures more effective than single strains?[J]. European Journal of Nutrition，2011，50(1)：1-17.

[10] DIEP D B，MATHIESEN G，EIJSINK V G，et al. Use of *Lactobacilli* and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology，2009，10(1)：62-73.

[11] CAGNO R D，ANGELIS M D，CALASSO M，et al. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400：induction of plantaricin A (PlnA) under co-

cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells[J]. Proteomics,2010,10(11):2175-2190.

[12] SCOURBOUTAKOS M J, FRANCO-ARELLANO B, MURPHY S A, et al. Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products[J]. Nutrients, 2017,9(4):400.

[13] 程秋涵. 缓解细菌性阴道炎益生菌的筛选及缓解效果评价[D]. 无锡:江南大学,2022.

[14] 张丽丽. 卷曲乳杆菌比较基因组学分析及其缓解念珠性阴道炎的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

[15] 张莹. 两歧双歧杆菌耐渗关键分子机制及制备工艺的研究[D]. 无锡:江南大学,2022.

[16] 张程程. 中国不同地区人群肠道中长双歧杆菌的生理特性及肠道调节功能分析[D]. 无锡:江南大学,2021.

[17] Milk and milk products: determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB):ISO 10932:2010[S]. ISO,2010.

[18] 余萌,王似锦,曹蕊,等. 洋葱伯克霍尔德菌群(Bcc)的选择和分离培养基研究[J]. 中国药事,2022,36(7):746-757.
YU M, WANG S J, CAO R, et al. Study on selection and subculture agar of *Burkholderia cepacia* complex[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2022, 36(7): 746-757. (in Chinese)

[19] ÖZÇAM M, OH J H, TOCMO R, et al. A secondary metabolite drives intraspecies antagonism in a gut symbiont that is inhibited by cell-wall acetylation[J]. Cell Host & Microbe,2022,30(6):824-835.

[20] WEISS A S, BURRICHTER A G, DURAI RAJ A C, et al. *In vitro* interaction network of a synthetic gut bacterial community[J]. The ISME Journal, 2022, 16(4): 1095-1109.

[21] 高欣伟,崔树茂,唐鑫,等. 长双歧杆菌的最适底物解析和高密度发酵工艺优化[J]. 食品与发酵工业,2021,47(19):12-20.
GAO X W, CUI S M, TANG X, et al. Optimization of substrate in high-density fermentation of *Bifidobacterium longum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19):12-20.(in Chinese)

[22] 姜滢滢,朱双双,章苗,等. 微生物共培养研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2017,29(2):239-244.
JIANG Y Y, ZHU S S, ZHANG M, et al. Progress in research on microbial co-culturing[J]. Chinese Journal of Microecology,2017,29(2):239-244.(in Chinese)

[23] 赵建新,田丰伟,陈卫,等. 酸奶中嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌检测方法的研究[J]. 中国乳品工业,2005,33(2):54-57.
ZHAO J X, TIAN F W, CHEN W, et al. Study on the determination method of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in yogurt[J]. China Dairy Industry,2005,33(2):54-57.(in Chinese)

[24] CHOI S Y, CHANG C E, KIM S C, et al. Antimicrobial susceptibility and strain prevalence of Korean vaginal *Lactobacillus* spp.[J]. Anaerobe,2003,9(6):277-280.

[25] BISCHOFF K M, SKINNER-NEMEC K A, LEATHERS T D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007,34(11):739-744.

[26] FUKAMI T. Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics,2015,46:1-23.

[27] MAYFIELD M M, LEVINE J M. Opposing effects of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities[J]. Ecology Letters, 2010, 13(9): 1085-1093.

[28] BRUDZYNSKI K. Honey as an ecological reservoir of antibacterial compounds produced by antagonistic microbial interactions in plant nectars, honey and honey bee[J]. Antibiotics,2021,10(5):551.

[29] BROCHET S, QUINN A, MARS R A T, et al. Niche partitioning facilitates coexistence of closely related honey bee gut bacteria[J]. eLife,2021,10:e68583.

[30] AMABEBE E, ANUMBA D O C. The vaginal microenvironment: the physiologic role of *Lactobacilli*[J]. Frontiers in Medicine,2018,5:181.

[31] FRIEDMAN J, HIGGINS L M, GORE J. Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms[J]. Nature Ecology & Evolution, 2017, 1:109.

[32] DEINES P, HAMMERSCHMIDT K, BOSCH T C G. Microbial species coexistence depends on the host environment[J]. mBio,2020,11(4):e00807-e00820.

[33] LI X Y, PIETSCHKE C, FRAUNE S, et al. Which games are growing bacterial populations playing?[J]. Interface,2015,12(108):20150121.

(责任编辑:周玥)