

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2015-0118

任海伟, 赵拓, 李金平, 李雪雁, 李志忠, 徐娜, 王永刚, 喻春来, 高晓航, 王晓力. 玉米秸秆与废弃白菜混贮料的发酵特性及其乳酸菌分离鉴定[J]. 草业科学, 2015, 32(9): 1508-1517.

REN Hai-wei, ZHAO Tuo, LI Jin-ping, LI Xue-yan, LI Zhi-zhong, XU Na, WANG Yong-gang, YU Chun-lai, GAO Xiao-hang, WANG Xiao-li. Identification of lactic acid bacteria and fermentation characteristics of mixed ensilages of corn stover and cabbage waste[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(9): 1508-1517.



玉米秸秆与废弃白菜混贮料的发酵特性及其乳酸菌分离鉴定

任海伟^{1,2,3}, 赵拓², 李金平^{1,3}, 李雪雁², 李志忠²,
徐娜², 王永刚², 喻春来², 高晓航², 王晓力⁴

(1. 兰州理工大学西部能源与环境研究中心, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050;
3. 甘肃省西北低碳城镇支撑技术协同创新中心, 甘肃 兰州 730050; 4. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要:将玉米秸秆(*Zea mays*)与废弃白菜(*Brassica pekinensis*)进行不同比例(玉米秸秆与废弃白菜鲜质量比分别为 29:19、27:21、25:23、23:25、21:27 和 19:29)混合青贮, 研究二者混贮 60 d 时的化学组分和发酵品质, 筛选出发酵品质最好的混贮比例, 并对最优混贮料中的乳酸菌进行分离鉴定。结果表明, 所有混贮组的 pH 值均显著低于玉米秸秆单贮组($P < 0.05$), 说明混合青贮品质优于单独青贮。混贮组中 ME5 组品质最佳, pH 值和氨态氮/总氮显著低于其他混贮组(除 ME4 组外, $P < 0.05$), 乳酸含量显著高于其他混贮组(除 ME1 组外, $P < 0.05$)。从 ME5 组中分离得到 12 株乳酸菌。分别为 1 株短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、3 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、7 株戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和 1 株肠道肠球菌(*Enterococcus hirae*)。ME5 组中乳杆菌属和片球菌属为优势属, 且以同型发酵乳酸菌为主。

关键词:玉米秸秆; 废弃白菜; 混合青贮; 青贮品质; 乳酸菌; 16SrRNA

中图分类号: S816.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2015)09-1508-10*

Identification of lactic acid bacteria and fermentation characteristics of mixed ensilages of corn stover and cabbage waste

REN Hai-wei^{1,2,3}, ZHAO Tuo², LI Jin-ping^{1,3}, LI Xue-yan², LI Zhi-zhong², XU Na²,
WANG Yong-gang², YU Chun-lai², GAO Xiao-hang², WANG Xiao-li⁴

(1. China Western Energy & Environment Research Center, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
2. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
3. China Northwestern Collaborative Innovation Center of Low-carbon Urbanization Technologies, Lanzhou 730050, China;
4. Animal and Veterinary Pharmaceutics Science of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: To explore the feasibility of corn stover (CS) and cabbage waste (CW) mixed silage, the effects of different ratio on ensilages quality were studied to assess the best ration of two materials. Meanwhile, conventional identification methods and 16SrRNA sequence analysis were employed to analyze the lactic

* 收稿日期: 2015-02-27 接受日期: 2015-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(51366009); 甘肃省自然科学基金项目(145RJZA064); 兰州市人才创新创业专项(2014-2-20); 兰州理工大学“红柳青年教师培养计划”(Q201207)

第一作者: 任海伟(1983-), 男, 山西孝义人, 副教授, 在读博士生, 主要从事可再生能源与环境工程研究。

E-mail: rhw52571119@163.com

通信作者: 李金平(1977-), 男, 宁夏中宁人, 教授, 博导, 博士, 主要从事先进可再生能源系统方面研究。

E-mail: lijinpings77@163.com

acid bacteria diversity from the optimum mass ratio of CS and CW ensilages. The results showed that the pH value of all the mixed silages were lower than CS solely ensilages (SECS, $P < 0.05$) which mean that the quality of mixed ensilages were better than CS sole ensilages. The ME5 group was the optimal mass ratio in mix-ensiling groups. A total number of 12 lactic acid bacteria were isolated from the ME5 group, which belonged to the three different generas (*Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Enterococcus*). Among these isolates, *Lactobacillus* and *Pediococcus* were the predominant strains (91.7% of the total isolates). They were composed of 1 strain of *L. brevis*, 3 strains of *L. plantarum*, 7 strains of *P. pentosaceus* and 1 strain of *E. hirae* which mainly were homofementative of lactobacillus. The research result supported that the way of CS and CW mixed ensilages was feasible and had laid the foundation for preparing an excellent lactic acid bacteria addictive for silage.

Key words: corn stover; cabbage waste; mixed ensilages; ensilages quality; lactic acid bacteria; 16SrRNA
Corresponding author: REN Hai-wei E-mail: rhw52571119@163.com

玉米 (*Zea mays*) 秸秆是规模化沼气工程的重要生产原料,但秸秆的季节性集中收获常导致秸秆收集总量远高于即时贮存作业量和利用量,萎蔫或干黄极易造成秸秆水分和营养物质的损失。为保障秸秆原料的可持续供应,必须寻找一种秸秆的长时间贮存方法^[1]。青贮是在厌氧条件下,利用植物表面附生的乳酸菌发酵原料中的可溶性糖并转化为乳酸等有机酸,使发酵体系 pH 值迅速降低,以抑制霉菌、梭菌等腐败微生物生长的方法,该方法能有效减少糖类物质的分解代谢并保持良好品质^[2-4]。

兰州市是高原夏菜主产区,2014年高原夏菜总产量约220万t,蔬菜流通的商业化发展和净菜加工产生了大量废弃蔬菜(尾菜),尾菜直接堆放或填埋产生的渗液常引发环境污染。尾菜中富含水分和糖分,若能利用干黄秸秆和尾菜在物理结构、营养成分及水分含量等方面的互补性进行混合贮存,不仅能长时间贮存干黄秸秆,还能减少废弃尾菜引起的环境污染。诸多学者研究表明,玉米秸秆与花椰菜 (*Brassica capitata*) 茎叶、苦豆子 (*Sophora alopecuroides*)、象草 (*Pennisetum purpureum*) 等原料进行混合青贮均能够有效提高青贮成功率和青贮品质,减少营养物质的损失^[5-7]。基于营养互补的混合青贮品质优于单一原料。

乳酸菌数量及其多样性是决定青贮品质的关键因素,了解青贮中乳酸菌多样性具有重要意义。青贮中常见乳酸菌包括乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 和魏斯氏菌属 (*Weissella*) 等^[8-10]。Tohno 等^[11] 还分离

到棒状乳杆菌棒状曲亚种 (*Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens*) 和肠膜明串珠菌葡聚糖亚种 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*)。Cai 等^[12] 分离了新种 *Lactobacillus nasuensis* sp. nov.。司丙文等^[13] 分离鉴定了蒙氏肠球菌 (*Enterococcus mundtii*) 和乳酸球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。詹发强等^[14] 发现青贮玉米中乳酸菌主要为乳杆菌属和片球菌属。

本研究利用青贮原理,将玉米秸秆和废弃白菜 (*Brassica pekinensis*) 采用不同比例进行混贮,从化学组分和发酵品质角度分析二者混贮 60 d 时的青贮效果,探寻最优混合比。同时,利用表型特征及 16S rRNA 序列分析技术相结合的方法对最优混贮组中的乳酸菌进行分离鉴定,为筛选乳酸青贮菌剂和干秸秆贮存过程调控奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

干玉米秸秆采自甘肃省定西市陇西县,摘穗收后一个月收集;废弃白菜收集自兰州市七里河区菜市场。两种原料的化学组分如表 1 所示。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Biomiga 公司。2×Taq MasterMix 购自上海美吉生物医药科技有限公司。DNA Marker-D 购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 混贮料的制作

将玉米秸秆切至 1~2 cm 后与长为 2 cm×2 cm 废弃白菜按不同质量比(依次为 29:19、27:21、25:23、23:25、21:27 和 19:29)进行混合,混匀

表 1 玉米秸秆和废弃白菜的化学组分
Table 1 Chemical compositions of corn stalk and cabbage waste

原料 Feed stock	干物质 DM	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF	半纤维素 HC
废弃白菜 Cabbage waste	5.58±0.15	21.29±1.20	13.19±0.97	8.11±0.46
玉米秸秆 Corn stalk	53.75±0.08	49.10±1.61	27.64±0.90	21.55±1.23

原料 Feed stock	纤维素 CL	综纤维素 HoC	酸性洗涤木质素 ADL	可溶性糖 WSC
废弃白菜 Cabbage waste	10.92±0.64	19.03±0.35	0.74±0.45	23.74±0.04
玉米秸秆 Corn stalk	25.74±0.63	47.29±0.52	1.72±0.14	28.15±0.15

后分别在 1.5 L 发酵瓶中装填压实密封保存。6 个混贮试验组对应的水分含量分别为 65%、67%、69%、71%、73% 和 75%，依次编号为 ME1、ME2、ME2、ME3、ME4、ME5 和 ME6。玉米秸秆单独贮存(SECS)作为对照。25 °C 恒温贮存 60 d，每个试验组设 3 个重复，共计 21 个青贮瓶。

1.3 化学组分与发酵品质分析方法

青贮料开封后称取 50 g 按 1 : 10 比例加入蒸馏水混合打浆，过滤后对滤液和滤渣进行分析。干物质含量(Dry matter, DM)采用 105 °C 烘干法。pH 值测定采用 PHS-3D 型 pH 计。氨态氮(Ammonia nitrogen, NH₃-N)测定采用苯酚-次氯酸钠比色法。中性洗涤纤维(Neutral Detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维(Acid detergent fiber, ADF)和酸性洗涤木质素(Acid detergent lignin, ADL)测定采用范氏分析法。纤维素(Cellulose, CL)、半纤维素(Hemicellulose, HC)和综纤维素(Holocellulose, HoC)含量通过公式计算获得, CL = ADF - ADL, HC = NDF - ADF, HoC = CL + HC^[3,10]。可溶性糖(Water soluble carbohydrates, WSC)测定采用蒽酮硫酸比色法^[5]。乳酸含量测定采用山东省科学院 SBA-40X 生物传感器。挥发性脂肪酸含量测定采用气相色谱法,进样口温度 200 °C,载气为高纯氮气(99.999%),不分流进样,升温程序:40 °C 保持 2 min,以 2 °C · min⁻¹ 速度升至 100 °C 后保持 5 min,再以 10 °C · min⁻¹ 速度升至 200 °C,保持 5 min。

1.4 乳酸菌的分离鉴定

无菌环境称取最优比例混贮料 25 g 加入到 225 mL 无菌生理盐水,37 °C 恒温振荡 2 h 充分混匀,将菌悬液进行梯度稀释,取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3 个稀释

度液体各 0.2 mL 分别涂布于乳酸菌培养基 MRS 平板上,每个稀释度做 3 个重复,37 °C 厌氧培养 72 h,挑取平板上不同的典型菌落分离纯化两次,观察记录菌落形态并进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验,4 °C 条件下保存备用。

生理生化试验包括明胶液化、吲哚试验、硝酸盐还原、H₂S 产气、精氨酸水解、0.1% 美兰还原、10 °C 和 45 °C 生长、pH 4.5 和 pH 9.6 生长、6.5% NaCl 生长试验等^[15]。对所有分离菌株采用微量发酵管法进行糖发酵试验,并与保加利亚乳杆菌标准菌株(*Lactobacillus bulgaricus*)JCM1002 和乳酸球菌乳酸亚种标准菌株(*Laccoccus lactis* subsp. lactis) IF012007 进行对比。

参考乳酸菌通用引物进行细菌 16SrDNA 基因扩增,正向引物为 27f: AGAGTTTGATCCTGG CTCAG^[12];反向引物为 1492r: CTACGGCTAC-CTTGTTACGA^[16],上述引物由上海桑尼生物技术有限公司合成。细菌基因组 DNA 提取严格按照试剂盒说明进行。PCR 扩增体系为 50 μL,2 × Taq MasterMix 25 μL、上下游引物各 2 μL、模板 DNA 1 μL、RNase-Free Water 20 μL。反应条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。预计扩增片段长度约为 1 500 bp。将 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

同源性与系统发育分析:将测序结果利用 DNASTAR 进行序列拼接处理,并与 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>)上 Microbes Nucleotide 数据库进行同源性比对分析,同时采用 MEGA 5.1 软件中的 Clustal W 对序列进行多重比较,利用邻

位相连法构建系统发育树,采用 Bootstrap 法对进化树进行 1 000 次重复统计验证,获得分类或系统发育地位^[17-18]。

1.5 数据分析

利用 SPSS 18.0 软件对试验数据进行统计分析,用平均值和标准误表示测定结果,对不同混合比例处理进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表数据存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同混合比例青贮料的化学成分分析

SECS 组的 DM、CL、NDF、ADF、ADL 和 HoC 含量显著高于 6 个混贮组($P < 0.05$) (表 2)。混贮组中,随着混贮料中废弃白菜比例的升高,CL、HC 和 HoC 含量呈先增加后减少的趋势(除 ME6 组外),ME2、ME3、ME6 之间和 ME4、ME5 之间 HoC 差异不显著($P > 0.05$)。所有混贮组的 ADL 含量

差异不显著。各试验组的 WSC 含量微弱,均小于 0.01% DM。总体来看,贮存 60 d 后各组化学成分变化规律不明显。

2.2 混合比例对发酵品质的影响

SECS 组的 pH 值显著高于 6 个混贮组($P < 0.05$) (表 3),pH 值高达 7.95。混贮组中,随着废弃白菜比例的增加,各组间 pH 值变化规律不明显,仅 ME5 组的 pH 值在 4.2 以下。ME2 组 AN/TN 显著高于 SECS 组和其余 5 个混贮组,且随着玉米秸秆比例的减少,混贮组中 AN/TN 呈先增加后减少的趋势(ME6 组除外),ME4 和 ME5 组的 AN/TN 较低,但两者间无显著差异。AN/TN 体现了青贮过程中蛋白质和氨基酸的分解程度,当青贮 pH 值大于 5.0 时,梭菌会利用游离氨基酸产生氨态氮从而影响青贮品质^[19]。说明若 pH 值高于 5.0 时蛋白质的过度分解会影响贮存品质,推测玉米秸秆单贮不利于蛋白质组分的保存。SECS 组的乳酸含量显

表 2 混合青贮不同比例的化学成分

Table 2 Chemical compositions of mixed silage for different ratios

%

分组 Group	干物质含量 DM	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF	酸性洗涤木质素 ADL
SECS	66.48±0.15a	75.73±0.01a	48.82±0.02a	0.07±0.54a
ME1	35.83±0.04e	61.94±0.01d	36.34±0.01c	0.03±0.27b
ME2	37.69±0.60d	63.39±0.01c	37.82±0.02b	0.03±0.17b
ME3	49.37±0.04b	64.52±0.03b	37.42±0.01b	0.03±0.47b
ME4	40.46±0.01c	59.16±0.03e	33.84±0.01d	0.02±0.30b
ME5	27.64±0.03f	59.30±0.04e	33.23±0.02d	0.02±0.23b
ME6	21.66±0.05g	64.41±0.03b	37.91±0.01b	0.03±0.06b
均方误差 MSE	0.236	0.229	0.229	0.027
分组 Group	纤维素 CL	半纤维素 HC	综纤维素 HoC	可溶性碳水化合物 WSC
SECS	40.51±0.63a	26.91±0.77a	67.42±0.54a	<0.01
ME1	32.77±0.40c	25.61±0.05d	58.38±0.21c	<0.01
ME2	34.25±0.67b	25.57±0.64d	59.82±0.57b	<0.01
ME3	32.70±0.34c	26.90±0.41a	59.60±0.32b	<0.01
ME4	30.49±0.28d	25.31±0.49d	55.80±0.38d	<0.01
ME5	29.52±0.24e	25.07±0.13c	54.59±0.16d	<0.01
ME6	33.24±0.49c	26.50±0.33b	59.74±0.25b	<0.01
均方误差 MSE	0.022	0.022	0.019	<0.01

注:表中同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: The means in the same column with different lower case letter indicate significant difference between different groups at 0.05 level. The same below.

表 3 混合比例对青贮发酵品质的影响

Table 3 Effects of mixed ratios on fermentation characteristics of silages

分组 Group	pH 值 pH value	乳酸 Lactic acid(LA)	乙酸 Acetic acid(AA)	丁酸 Butyric acid(BA)	氨态氮/总氮 AN/TN
SECS	7.95±0.04a	3.23±0.05e	<0.01	<0.01	0.53±0.01b
ME1	4.24±0.05d	6.81±0.04a	<0.01	<0.01	0.56±0.16b
ME2	4.32±0.02c	5.43±0.03c	<0.01	<0.01	1.12±0.02a
ME3	4.27±0.02b	6.56±0.04b	<0.01	<0.01	0.17±0.17c
ME4	4.58±0.01b	4.85±0.03d	<0.01	<0.01	0.03±0.03d
ME5	4.17±0.05e	6.79±0.02ab	<0.01	<0.01	0.04±0.02d
ME6	4.22±0.02d	5.63±0.02c	<0.01	<0.01	0.16±0.06c

著低于 6 个混贮组,且 ME1、ME3 和 ME5 组的乳酸含量显著高于 ME2、ME4 和 ME6 组。由于 AA 和 BA 含量微弱,浓度小于 0.01% DM,推测同型发酵乳酸菌占主导地位,有效抑制了梭菌产生 BA,提高了青贮发酵品质。

2.3 乳酸菌的分离鉴定

2.3.1 形态学鉴定 挑取 MRS 固体培养基上直径为 2~3 mm、乳白色、表面凸起、光滑圆整、大小不一的菌落,经革兰氏染色为阳性、过氧化氢酶试验为阴性的初步鉴定为乳酸菌,共分离出 12 株,分别编号为 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL 2-5、CSCWL 2-6、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9、CSCWL 2-10、CSCWL 2-11、CSCWL 2-12、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17。

2.3.2 生理生化鉴定 菌株 CSCWL 2-6、CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 为革兰氏阳性杆菌(表 4),过氧化氢酶试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验为阴性,不产生吲哚和硫化氢,pH 4.5

条件下能够正常生长,初步确定为乳杆菌属。

菌株 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL 2-5、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9 和 CSCWL 2-11 为革兰氏阳性球菌(表 5),过氧化氢酶试验、硝酸盐还原试验、pH 9.6 和 6.5% NaCl 生长试验为阴性,0.1% 美兰还原试验为阳性,在 15 °C 条件下生长,暂不能确定具体属;菌株 CSCWL 2-12 为革兰氏阳性球菌,过氧化氢酶试验、硝酸盐还原试验为阴性,0.1% 美兰还原试验、pH 9.6 和 6.5% NaCl 生长试验为阳性,在 15 和 45 °C 条件下生长,初步确定为肠球菌属。

菌株 CSCWL 2-6 在 15 °C 条件下生长,45 °C 条件下不生长(表 6),发酵葡萄糖产酸产气,精氨酸水解试验为阳性,可发酵利用果糖产酸,显微镜下为短杆状,符合短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)的特征,初步确定菌株 CSCWL 2-6 为短乳杆菌。菌株 CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 均能利用葡萄糖产酸但不产气,可发酵利用阿拉伯糖、麦芽

表 4 乳杆菌属的鉴定结果

Table 4 Identification of *Lactobacillus*

试验菌株 Strain	革兰氏染色 Gram staining	过氧化氢酶 Catalase test	硝酸盐还原 Nitrate reduction test	明胶液化 Gelatin liquefaction test	吲哚 Indole test	硫化氢产气 Hydrogen sulfide production test	pH 4.5 生长 Growth at pH 4.5
JCM1002	+	-	-	-	-	-	+
CSCWL 2-6	+	-	-	-	-	-	+
CSCWL 2-10	+	-	-	-	-	-	+
CSCWL 2-15	+	-	-	-	-	-	+
CSCWL 2-17	+	-	-	-	-	-	+

注: + 表示试验结果阳性; - 表示试验结果阴性。下同。

Note: +, positive; -, negative. The same below.

表5 球状乳酸菌的鉴定结果
Table 5 Identification of spherical lactic acid bacteria

试验菌株 Strain	革兰氏染色 Gram staining	过氧化氢酶 Catalase test	硝酸盐还原 Nitrate reduction test	15 °C生长 Growth at 15 °C	45 °C生长 Growth at 45 °C	pH 9.6 生长 Growth at pH 9.6	6.5% NaCl 生长 Growth at 6.5% NaCl	0.1%美兰还原 Methylene blue reduction test
IF012007	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-2	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-3	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-4	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-5	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-8	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-9	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-11	+	-	-	+	-	-	-	+
CSCWL 2-12	+	-	-	+	+	+	+	+

糖、果糖、半乳糖、乳糖、甘露醇、甘露糖、蜜二糖和纤维二糖产酸,不能水解精氨酸。分析以上结果符合植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的特征,初步确定菌株 CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 为植物乳杆菌。结合表 5 和表 6 结果,球状菌株中 CSCWL 2-12 能在 15 °C、45 °C、pH 9.6 和 6.5% NaCl 条件下生长,0.1%美兰还原试验为阳性,精氨酸产氨,利用葡萄糖产酸不产气,可发酵阿拉伯糖、果糖、半乳糖、蜜二糖、海藻糖、麦芽糖、纤维二糖和乳糖产酸,不发酵松三糖、蔗糖、鼠李糖、棉籽糖、甘露醇和山梨醇,根据以上结果暂不能在种的水平上做出准确判断。菌株 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL 2-5、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9 和 CSCWL 2-11 能够利用葡萄糖产酸但不产气,可发酵利用半乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖阿拉伯糖和乳糖产酸,不能发酵鼠李糖、海藻糖和甘露醇,符合戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)的特征,初步确定以上菌株为戊糖片球菌。

2.3.3 16SrRNA 序列同源性分析 提取 12 株乳酸菌基因组 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果为单一清晰条带,能满足 PCR 扩增条件。利用细菌通用引物进行 16SrRNA 基因序列扩增,发现各菌株 PCR 产物条带单一清晰,特异性条带扩增片段约为 1 500 bp,与贺银凤等^[20]、杜晓华等^[21]等结果一致,能进行 PCR 产物测序。将测序结果利用 DNASTAR 软件进行拼接处理,并与 Microbes Nucleotide 数据库已发表的序列比对分析,找出与目的序列同源性最高的菌种(图 1)。

由图 1 可知,菌株 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL 2-5、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9 和 CSCWL 2-11 聚为第 1 类群且相似性为 100%,与其他片球菌属标准菌株亲缘关系较近,可确定这 7 株菌为同一种片球菌属乳酸菌,序列对比结果与戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)的同源性最高;菌株 CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 聚为第 2 类群且与其他乳杆菌属标准菌株相似性达到 100%,可确定 3 株菌均为乳杆菌属乳酸菌,序列对比结果与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的同源性最高;菌株 CSCWL 2-6 单独聚为一类,与第 2 类群亲缘较近,序列对比结果与短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)的同源性最高;菌株 CSCWL 2-12 聚为第 3 类群且与其他肠球菌属标准菌株相似性达到 100%,可确定菌株 CSCWL 2-12 为肠球菌属乳酸菌,序列对比结果与肠道肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的同源性最高。

综合判定,菌株 CSCWL 2-6 为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*);菌株 CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*);菌株 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL 2-5、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9 和 CSCWL 2-11 为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*);菌株 CSCWL 2-12 为肠道肠球菌(*Enterococcus hirae*),该结果与 Pang 等^[22]报道基本一致。将分离得到的 12 株乳酸菌序列提交到 GenBank,所得注册号按菌株编号顺序依次为 KM668044—KM668055。

表 6 乳酸菌糖发酵试验结果
Table 6 Glycolysis function of lactic acid bacteria

试验菌株 Strain	JCM 1002	IF01 2007	CSCWL 2-2	CSCWL 2-3	CSCWL 2-4	CSCWL 2-5	CSCWL 2-6	CSCWL 2-8	CSCWL 2-9	CSCWL 2-10	CSCWL 2-11	CSCWL 2-12	CSCWL 2-15	CSCWL 2-17
15 °C 生长	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C 生长	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸水解	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Arginine and produces ammonia														
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose and produces acid														
葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose and produces gas														
阿拉伯糖	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose														
七叶苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin														
果糖	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
Fructose														
半乳糖	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose														
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose														
麦芽糖	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltose														
甘露醇	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Mannitol														
甘露糖	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Mannose														
松三糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Melezitose														
蜜二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Melibiose														
棉籽糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Raffinose														
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Rhamnose														
水杨苷	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Salicin														
蔗糖	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose														
海藻糖	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose														
木糖	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Xylose														
纤维二糖	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose														
山梨醇	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol														

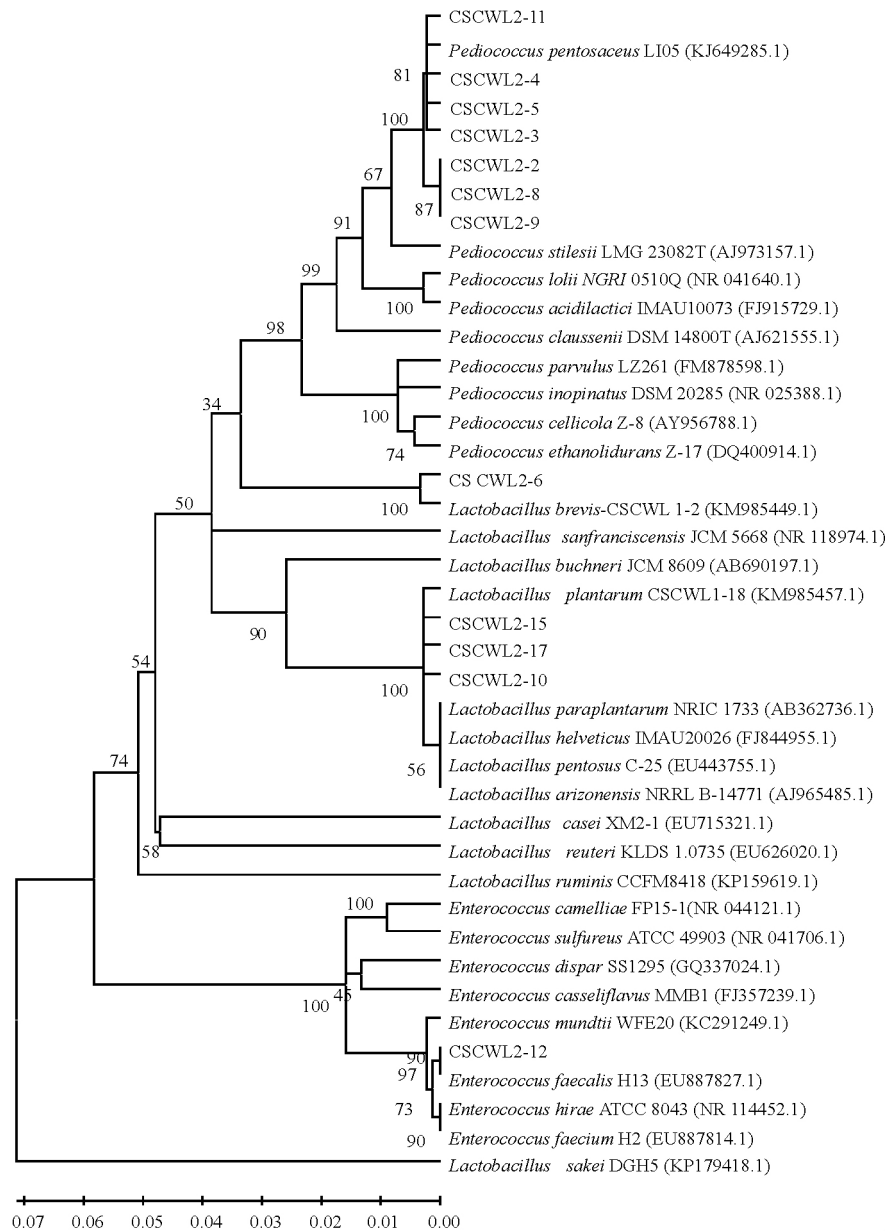


图1 基于16SrRNA序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence

注:图中分支数字表示 Bootstrap 验证中该分支可信度百分数;标尺表示序列差异度。

Note: Numbers in tree branch represent percentage of confidence for each branch; scale represent difference in sequence.

3 讨论与结论

干玉米秸秆的单一密闭贮存属于低水分青贮,通过造成微生物的生理干燥,抑制酵母菌、霉菌等不良发酵,且低水分对腐败微生物的抑制作用要强于对乳酸菌的抑制,使秸秆更易贮存。而玉米秸秆与白菜的混贮则属常规青贮,通过乳酸菌的繁殖和pH值快速下降抑制不良微生物。Wang等^[23]认为

成功青贮理论上所需的最低WSC含量为60~70 g·kg⁻¹ DM。本研究中,原料玉米秸秆干物质含量为53.75%,废弃白菜水分高达94.42%,WSC含量约为23.74%。两种原料的水分和糖分含量具有很高的互补性,将二者按一定比例混贮能够达到青贮含水量在65%~75%范围和最低WSC含量的基本要求^[19]。

优良青贮料的pH值介于3.8~4.2,当pH值

低于 4.2 时乳酸菌等有益菌发挥主要作用,梭菌等有害菌被抑制^[19]。试验中,ME5 组 pH 值在 4.2 以下,符合优质青贮的标准。这是由于混贮组中添加的废弃白菜有利于贮存体系中 WSC 含量的提高和乳酸发酵,pH 值的快速降低有效抑制了不利于青贮的肠细菌和梭菌等厌氧微生物生长。AN/TN 比值越高意味着贮存原料中蛋白质和氨基酸分解越多。试验中 ME5 组的 AN/TN 最低,说明蛋白质分解程度较轻。这与庄益芬等^[7]研究的象草与玉米秸秆混合青贮效果基本一致。综合化学成分和发酵品质的结果显示,混合青贮改善了玉米秸秆的青贮品质,且 ME5 组(干玉米秸秆与废弃白菜以 21:27)青贮效果最佳。16SrRNA 序列分析能准确、快速鉴定微生物,基于 16SrRNA 建立的系统进化树可以确定微生物在进化树中的位置。本试验采用传统微生物培养法和 16SrRNA 序列分析法,从 ME5 组中分离得到的 12 株乳酸菌分属于 3 个属,4 个种。3 个属分别为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)和肠球菌属(*Enterococcus*),4 个种分别为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和肠道肠球菌(*Enterococcus hirae*)。12 株乳酸菌在分类地位中同属于细菌域、厚壁菌门、杆菌纲、乳杆菌目,其中菌株 CSCWL 2-6、CSCWL 2-10、CSCWL 2-15 和 CSCWL 2-17 属于乳杆菌科、乳杆菌属;菌株 CSCWL 2-2、CSCWL 2-3、CSCWL 2-4、CSCWL

2-5、CSCWL 2-8、CSCWL 2-9 和 CSCWL 2-11 属于乳杆菌科、片球菌属;菌株 CSCWL 2-12 属于肠球菌科、肠球菌属。除菌株 CSCWL 2-6 能够利用葡萄糖产酸产气,为异型发酵乳酸菌外,其余菌株均为同型发酵乳酸菌。崔棹茗等^[24]采用传统微生物培养法和 16SrRNA 序列分析法,从青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum* Hook. f.)秸秆青贮饲料中分离得到植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)。杨晓丹等^[25]经传统微生物培养和 16SrRNA 序列分析从西藏豆科牧草青贮饲料中分离得到戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)。杨杨等^[26]利用传统培养法和 16SrRNA 序列分析从青藏高原藏北嵩草(*Kobresia littledelei*)中分离得到 17 株乳酸菌,其中有 6 株菌为食窦魏斯氏乳酸菌(*Weissella confusa*),其余均为融合魏斯氏乳酸菌(*W. cibaria*)。说明将传统微生物培养法和 16SrRNA 序列分析法相结合进行青贮料中乳酸菌的分离鉴定方法可行。但由于传统分离培养方法的局限性,若要全面了解青贮料中的乳酸菌多样性,还需要利用高通量测序方法进一步研究。

本试验分离得到的植物乳杆菌、戊糖片球菌和短乳杆菌和肠道肠球菌均为青贮用常见乳酸菌菌种,这也为今后制备优良的青贮添加剂提供了可能。

参考文献

- [1] Kampmann K, Ratering S, Gei Bler-Plaum R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S. Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 174(12):108-117.
- [2] 郭天龙. 凋萎及不同添加剂对甜菜茎叶青贮品质的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学硕士论文, 2009.
- [3] Zheng Y, Yu C W, Cheng Y S, Jenkins B, VanderGheynst J S. Effects of ensilage on storage and enzymatic degradability of sugar beet pulp[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2):1489-1495.
- [4] Stevenson D M, Muck R E, Shinnors K J, Weimer P J. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(3):329-338.
- [5] 杨道兰, 汪建旭, 冯炜弘, 张艳, 尹燕, 王永林. 花椰菜茎叶与玉米秸秆的混贮品质[J]. *草业科学*, 2014, 31(3):551-557.
- [6] 黄晓辉, 李树成, 李东华, 王彦荣. 苦豆子和玉米秸秆的混合青贮[J]. *草业科学*, 2013, 30(10):1633-1639.
- [7] 庄益芬, 廖慧珍, 陈鑫珠, 陈梅芳, 洪志勇, 张文昌. 象草与玉米秸秆混合青贮效果的研究[J]. *草业科学*, 2012, 29(6):

- 1002-1006.
- [8] Phakachod N, Suksombat W, Colombatto D, Beauchemin K A. Use of fibrolytic enzymes additives to enhance in vitro ruminal fermentation of corn silage[J]. *Livestock Science*, 2013, 157(1):100-112.
- [9] Queiroz O C, Adesogan A T, Arriola K G, Queiroz M F. Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(6):3354-3362.
- [10] Han L Y, Zhou H. Effects of ensiling processes and antioxidants on fatty acid concentrations and compositions in corn silages[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2013, 5(1):208-214.
- [11] Tohno M, Kobayashi H, Nomura M, Kitahara M, Ohkuma M, Uegaki R, Cai Y M. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 83(2):111-120.
- [12] Cai Y M, Pang H L, Kitahara M, Ohkuma M. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(5):1140-1144.
- [13] 司丙文, 王宗礼, 孙启忠, 徐春城, 李峰, 陶雅. 山竹岩黄芪青贮中优质乳酸菌的分离和鉴定[J]. *草地学报*, 2012, 20(1):166-170.
- [14] 詹发强, 包慧芳, 崔卫东, 王伟. 玉米青贮过程中乳酸菌动态变化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6):834-838.
- [15] 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013:285-286.
- [16] Jensen M A, Webster J A, Strauss N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms[J]. *Applied Polymerase Environmental Microbiology*, 1993, 59(4):945-952.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method; A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4):406-425.
- [18] Tan Z F, Pang H L, Duan Y H, Qin G Y, Cai Y M. 16S ribosomal DNA analysis and characterization of lactic acid bacteria associated with traditional Tibetan Qula cheese made from yak milk[J]. *Animal Science Journal*, 2010, 81(6):706-713.
- [19] 徐春城. 现代青贮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [20] 贺银凤, 靳焯, 田建军, 吴敬, 张开屏. 两株产抑菌物质乳酸菌的鉴定及系统发育分析[J]. *食品科学*, 2009, 30(19):232-235.
- [21] 杜晓华, 艾日登才次克, 李莉, 王伟宏, 张彦斌, 崔利敏, 于洁, 张家超, 刘文俊, 孙志宏, 孙天松, 张和平, 孟和毕力格. 蒙古国地区酸乳中乳酸菌的鉴定及耐酸菌株筛选[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7):994-1000.
- [22] Pang H L, Zhang M, Qin G Y, Tan Z F, Li Z W, Wang Y P, Cai Y M. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stover[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 82(5):642-653.
- [23] Wang J Q, Zhou H, Feng T. Effects of addition of previously fermented juice prepared from alfalfa on fermentation quality and protein degradation of alfalfa silage[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 151(3):280-290.
- [24] 崔焯茗, 郭刚, 原现军, 李君风, 杨晓丹, 丁良, 余成群, 邵涛. 青稞秸秆青贮饲料中优良乳酸菌的筛选及鉴定[J]. *草地学报*, 2015, 23(3):607-615.
- [25] 杨晓丹, 原现军, 郭刚, 崔焯茗, 李君风, 白晰, 巴桑, 邵涛. 西藏豆科牧草青贮饲料中耐低温优良乳酸菌的筛选[J]. *草业学报*, 2015, 24(6):99-107.
- [26] 杨杨, 石超, 郭旭生. 高寒草甸魏斯氏乳酸菌的分离鉴定及理化特性研究[J]. *草业学报*, 2014, 23(1):266-275.

(责任编辑 张瑾)