

秸秆发酵乳酸菌复合系 SFC-2 的构建及其组成多样性研究

高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 李献梅, 崔宗均*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 为了获得促进作物干秸秆乳酸发酵的微生物, 以玉米秸秆和水稻秸秆的自然发酵物为菌种来源, 用 MRS 蔗糖培养基, 通过连续定向继代培养, 筛选出 pH 下降迅速、乳酸含量高、组成稳定的乳酸菌复合系 SFC-2. DGGE 分析表明, SFC-2 经过连续继代培养, 从第 25 代开始其微生物组成基本稳定. SFC-2 培养 12 h 后 pH 下降至 3.8, 乳酸含量达 10.64 mg/mL, 其中 64% 为 L-(+) 乳酸. 通过平板分离获得 4 株细菌, 全部为 *Lactobacillus*, 其近缘种分别为 *L. fermentum*、*L. plantarum*、*L. paracasei* 和 *L. paracasei* sub sp.; 通过 16S rDNA 克隆文库分析获得 7 个克隆, 其近缘种主要为 *L. fermentum*、*L. plantarum* 及 *L. paracasei*; 在 16S rDNA 的克隆文库中, 76.3% 为 *L. fermentum* 的近缘种, 20.3% 为 *L. plantarum* 的近缘种, 3.4% 为 *L. paracasei* 的近缘种.

关键词: 秸秆发酵; 乳酸菌; 复合系; 多样性; 克隆文库

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1088-07

Construction and Composition Diversity of a Lactic Acid Bacterial Community SFC-2

GAO Li-juan, WANG Xiao-fen, YANG Hong-yan, LI Xian-mei, CUI Zong-jun

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: To obtain the community that could accelerate the fermentation of the air-dried crop straws, a lactic acid bacteria community SFC-2 was constructed from the natural fermented products of the corn straw and rice straw by continuous restricted subcultivation in the MRS-S broth. The SFC-2 could lower the pH of the broth quickly, and produce high amount of lactic acid. The microbial composition of the SFC-2 became stable from the 25th generation according to the results of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The pH value of the SFC-2 dropped to 3.8 and the amount of lactic acid reached 10.64 mg·mL⁻¹ after 12 h cultivation in the broth, which contained 64% L-(+) lactic acid. Using morphological methods, four strains were isolated from the SFC-2 and they all belonged to *Lactobacillus*. The closest species were *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. paracasei* and *L. paracasei* sub sp., respectively. At the same time, the composition of the SFC-2 was also analyzed by constructing 16S rDNA clone library. The results of 16S rDNA sequencing showed that the closest species of seven clones were mainly *L. fermentum*, *L. plantarum* and *L. paracasei*. In clone libraries, 76.3% belonged to *L. fermentum*, 20.3% belonged to *L. plantarum* and 3.4% belonged to *L. paracasei*.

Key words: straw fermentation; lactic acid bacteria; community; diversity; clone library

据统计, 中国农作物秸秆每年约产生 6.5 ~ 7 亿^[1], 是一种宝贵的生物资源. 但近些年来, 由于农民耕作习惯的改变, 农作物秸秆资源一直未能得到有效开发利用. 在夏、秋 2 季作物收获期间, 出现了大面积连片焚烧秸秆的现象. 一方面, 造成很大范围的大气环境污染, 大量航班被迫停飞, 许多高速公路被迫关闭, 严重影响了国民经济的健康发展和人民群众的日常生活^[2]; 另一方面, 大量焚烧秸秆, 也是对资源的浪费. 因此, 解决我国剩余秸秆问题对资源利用和治理地球环境污染极其重要. 农作物秸秆中不仅含有大量的纤维素、木质素, 还含有一定数量的粗蛋白、粗纤维、磷、钾等营养成分和许多微量元素^[3]. 在能源紧缺的今天, 大力开发秸秆等生物质可再生能源, 有利于改善人类生存的环境, 有利于我

国经济的可持续发展.

目前, 对秸秆的综合利用大致有发展秸秆能源、秸秆饲料、秸秆肥料等方面. 秸秆作为反刍动物的饲料是解决秸秆污染问题和饲料来源的重要途径. 中国畜牧业正朝着“节粮型”结构调整, 未来 10 a 农业部制定的全国秸秆养畜过腹还田项目的发展目标是: 到 2010 年我国的秸秆饲用率要达到 55%^[4]. 但是, 由于秸秆养分低, 嗜口性差, 消化率低, 因而如何提高秸秆的嗜口性, 提高饲用价值是解决我国秸

收稿日期: 2006-08-13; 修订日期: 2006-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571088)

作者简介: 高丽娟(1978 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为生物质资源利用及微生物生态, E-mail: aglj889@sohu.com

* 通讯联系人, E-mail: gaolijuan@cau.edu.cn

秆公害、提高有机物利用率的一大热点. 通过微生物发酵是提高秸秆嗜口性和饲用价值的重要途径之一. 近年研究发现, 通过限制性培养定向驯化自然微生物群体, 可获得微生物组成稳定、功能强大、并对外界环境稳定的微生物群体^[5]. 笔者等以自然发酵物为菌源, 通过长期定向限制性培养筛选出一组 pH 下降迅速、乳酸产量高、对环境变化耐性强的乳酸菌复合系, 研究了该复合系的代谢性质、微生物组成多样性以及复合系和各分离菌在秸秆发酵中的定殖、消长动态. 本研究报告了该复合系的筛选过程、代谢性质, 通过传统的分离法和克隆文库法分析了微生物组成多样性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种筛选

筛选菌种 SFC-2 来源于中国农业大学科技园区收获籽粒后的玉米和水稻干秸秆. 2 种干秸秆粉碎成 1~2 cm 长, 加水至最终含水量为 70%, 填装于 100 mL 的螺口瓶, 2 种秸秆各装 10 瓶, 封口后置于 30℃ 恒温下自然发酵. 发酵 1 周后, 选择 pH 下降至 4.0 以下并发出酸香味的发酵物作为筛选菌群来源. 将 MRS 培养液和 MRS-S 培养液分别装 9 个 50 mL 的螺口瓶, 使液体达到瓶容积的 90%, 每种培养基设 3 组, 分别加入玉米秸秆发酵物、水稻秸秆发酵物及前 2 者的混合物, 各 3 次重复. 每瓶加入 5.5 g 鲜重的发酵料, 30℃ 静置培养. 培养 72 h 后, 按 5% (体积分数) 的接种量转接培养物连续继代培养, 保留 pH 下降迅速, 产乳酸量较多且对外界环境变化相对稳定的培养物, 淘汰与之相反的培养物, 直到获得性质和菌种组成稳定的培养物.

1.1.2 培养基及培养条件

菌群筛选和乳酸菌的培养用 MRS 培养基(1 L 中蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母粉 5 g, K₂HPO₄ 2 g, 柠檬酸二铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 葡萄糖 20 g, 吐温 80 1 mL, MgSO₄·7H₂O 0.58 g, MnSO₄·4 H₂O 0.25 g, pH 调至 6.2~6.4, 115℃ 灭菌 20 min) 和 MRS-S 培养基(MRS 培养基中葡萄糖改为蔗糖), 做固体平板时加 15 g/L 琼脂, 没有特殊说明时培养条件均为 30℃ 静置培养.

1.2 发酵产物测定

pH 的测定使用 HORIBA B-212 微量 pH 计. 将培养液过 0.22 μm 滤膜后, 使用日本岛津的 QP5050 气质联机测定其组分. 分析柱: CP-Chirasil-Dex CB 型

毛细管柱(25 m × 0.25 mm); 柱箱温度程序: 50℃ 2 min 后以 5 °C/min 速度升至 100℃, 再以 15 °C/min 速度升至 190℃, 保持 2 min, 共 18 min; 汽化温度: 190℃; 检测器温度: 230℃; 检测器电压: 1.5 kV; 载气: 氦气(64 kPa), 流量: 30 mL/min; 进样器: 分流, 分流比 1/22.

1.3 DNA 的提取

DNA 的提取采用苯酚-氯仿抽提法^[6].

1.4 PCR-DGGE 及 DGGE 条带序列分析

选用引物 357F-GC (GC clamp-5'-CCTACGGGA GGCAGCAG-3', 其中 GC-clamp 序列为 5'-CGCCCG CCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') 和 517R (5'-GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG-3')^[7] 扩增细菌 16S rDNA V3 区域, 供 DGGE 分析. PCR 反应体系为(50 μL): 模板 DNA 10 ng, 10 × PCR Gold Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, dNTP mix (各 2 mmol/L) 5 μL, 45 μmol/L 357F-GC 和 517R 各 0.5 μL, 5 Unit/μL Ampli Taq Gold 0.2 μL. PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 93℃ 1 min, 48℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 5 min. PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

DGGE 采用美国 Bio-Rad DCode 突变检测系统, 方法参照文献[5]. 聚丙烯酰胺梯度胶浓度为 6%~12% (质量浓度), 以 0.5 × TAE 为电泳缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 10 mmol/L 乙酸, 0.5 mmol/L EDTA), 变性剂梯度为 20%~60% (100% 的变性剂组成为尿素 7 mol/L, 甲酰胺体积分数为 40%), 于恒定电压 200 V 和 61℃ 下电泳 5 h, SYBR Green I 染色 30 min, 紫外凝胶成像系统分析结果. 从 DGGE 胶中回收的条带 DNA, 在相同反应条件下再次扩增, 扩增产物使用 QIAGEN 的 QIAquick PCR purification kit 纯化, 并检测为单个条带后用于测序^[8]. 测序反应使用 ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 及 357F(无-GC) 和 517R, 在 ABI 3130XL DNA 测序仪上分析序列, 操作过程按 Applied Biosystems 公司操作说明书进行.

1.5 菌株的分离纯化及 16S rDNA 测序

将 SFC-2 培养物按 10 倍梯度制作稀释液, 涂在 MRS-S 固体平板, 于 30℃ 厌氧培养, 根据菌落形态移至新鲜的平板培养基, 经纯化 3 次后, 用灭菌的牙签挑取少量的单菌落, 作为 PCR 的模板, 用 DGGE 辅助筛选不同的菌株. 得到的单一菌株再通过富集培养, 收集菌体细胞, 提取 DNA. 用通用引物 27F 和 1492R^[8] 扩增复合系中细菌 16S rDNA 全长序列, PCR

反应体系同上,反应条件为:95℃预变性 10 min,93℃ 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,共 25 个循环,最后在 72℃下延伸 5 min.序列分析方法同 1.4.

1.6 16S rDNA 克隆文库的建立及其序列分析

16S rDNA 克隆文库的构建方法参照文献[8]. 16S rDNA 扩增产物纯化后插入 pGEM® -T Easy 载体并转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109.在 LB 培养基平板培养转化物后,挑选白色菌落进行菌落 PCR-DGGE(16S rDNA V3),选取不同位置条带对应的菌落富集培养,SDS 碱裂解法[9]提取质粒,序列分析同 1.4.

1.7 系统树的建立

所有序列的相似性比对通过 BLAST 检索进行.系统树的建立应用 CLUSTAL_X(Version 1.81)软件包[10]和 MEGA(Version 2.1)软件[11],参照 neighbor-joining 法进行.

1.8 玉米秸秆接种实验

采用中国农业大学科技园区收获籽粒后风干的玉米秸秆,粉碎成 1~2 cm 长,加纯水至含水量为 70%(质量浓度),用 MRS-S 培养液培养 24 h 的乳酸菌复合菌系 SFC-2 按 1×10^6 CFU/g(湿重)喷洒,均匀搅拌,装满 100 mL 的螺口瓶密封,30℃培养.以加等量无菌培养基的处理为对照,各 15 次重复,分别于发酵开始后第 2,7,10,15,30 d 各取 3 次重复测定以下项目.

取发酵料 0.5 g 置于 4.5 mL 无菌水中,振荡后静置 20 min,取汁液测定 pH 和乳酸菌.取发酵料 1 g,加 2 mL 纯水,充分振荡静置后挤汁液过 0.22 μm 滤膜,测定乳酸,方法同 1.2.经 60℃、48 h 烘干后粉碎,过 40 目筛,可溶性糖 WSC(Water-soluble carbohydrates)的测定采用恩酮比色法[12],粗蛋白的测定用凯氏定氮法,粗纤维的测定用酸碱洗涤法,粗脂肪的测定用索氏提取法,具体方法均按文献[13]所介绍的步骤进行.

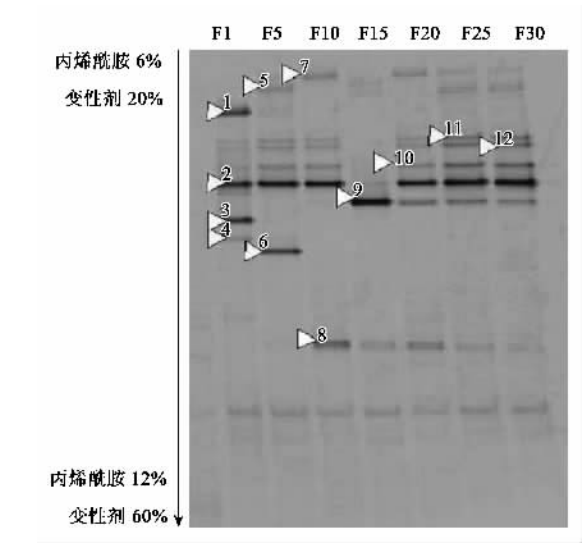
1.9 核苷酸序列的基因库登录号

本实验所得 16S rDNA 序列已向 GenBank/EMBL/DDBJ 登陆,登录号分别为:DQ399350~DQ399351(分离菌),DQ399353~DQ399354(分离菌),DQ399355~DQ399356(克隆),DQ486144~DQ486148(克隆),DQ515862~DQ515873(DGGE 条带).

2 结果与分析

2.1 SFC-2 的筛选

将玉米和水稻干秸秆自然发酵物及两者的混合物分别接种到 MRS 培养液和 MRS-S 培养液,进行连续继代培养,在培养过程中保留 pH 下降迅速,产乳酸量较多且对外界环境变化相对稳定的培养物.从第 25 代开始,以玉米秸秆和水稻秸秆自然发酵物混合接种于 MRS-S 的培养物较其他培养物 pH 下降快,产 L-(+)乳酸较多,各代之间 pH 变化趋势稳定,将该发酵物标记为 SFC-2,供以后的实验.对 SFC-2 菌系筛选过程中第 1、5、10、15、20、25 和 30 代的 24 h 培养物进行了 16S rDNA 的 PCR-DGGE 分析(图 1).由图 1 可见,培养的第 1 代(line)主要出现 1、2、3 和 4 这 4 个条带,还有 3 个较弱的条带分别与条带 10、11 和 12 在同一水平位置.到第 5 代时,条带 1 和条带 3 消失,增加了条带 5 和条带 6,但随后又消失.从第 10 代开始,出现了条带 7 和条带 8,第 15 代开始又出现了条带 9,25 代开始 DGGE 图谱基本稳定,主要条带为 8、9、10、11、12,这些条带的近缘种全部为乳酸菌.另外,还存在较弱的条带 5 和条带 7.



1. *L. pentosus* (99.5); 2. *L. plantarum* (99.3); 3. *Pantoea toletana* (97.3); 4. *L. brevis* (98.0); 5. Uncultured bacterium (98.5); 6. *L. farcininis* (100.0); 7. Uncultured bacterium (96.1); 8. *L. paracasei* (100.0); 9. *L. fermentum* (97.9); 10. *L. plantarum* (97.9); 11. *L. plantarum* (100.0); 12. *L. plantarum* (100.0)

图 1 SFC-2 筛选过程中各代微生物菌群的 PCR-DGGE 图谱
Fig.1 PCR-DGGE profiles of F1, F5, F10, F15, F20, F25 and F30 of the SFC-2 during the construction

2.2 SFC-2 复合系的菌种组成多样性

采用 MRS-S 培养基平板培养,根据菌落形态、革兰氏反应及菌体形态从 SFC-2 第 25 代培养物分离到 4 株单菌,它们均属于乳酸杆菌(*Lactobacillus*),

其近缘种分别为 *L. fermentum*、*L. plantarum*、*L. paracasei* 和 *L. paracasei* sub sp. (标记为 SFCB2-1i、SFCB2-2i、SFCB2-4i 和 SFCB2-5i)。

同时采用 16S rDNA 克隆文库方法对 SFC-2 的组成多样性进行了分析, 随机选择 148 个白色菌落, 经过 PCR-DGGE 筛选, 最后选定了 16S rDNA 在 DGGE 图谱上处于不同位置的 7 个白色菌落 (标记为 SFCB2-6c ~ SFCB2-12c) 进行序列分析. 结果在 7

个克隆中, SFCB2-6c、SFCB2-10c、SFCB2-11c、SFCB2-8c 和 SFCB2-12c 5 个克隆与 *L. fermentum* 相似率最高 (表 1), SFCB2-7c 和 SFCB2-9c 分别与 *L. plantarum* 和 *L. paracasei* 相似率最高. 在 148 个克隆文库中 112 个 (76.3%) 为 *L. fermentum* 的近缘种, 30 个 (20.3%) 为 *L. plantarum* 的近缘种, 5 个 (3.4%) 为 *L. paracasei* 的近缘种, 分别对应图 1 中的条带 9、2 和 8 (表 1)。

表 1 克隆文库的 16S rDNA 序列分析
Table 1 Analysis of 16S rDNA of clone library

菌株	登陆号	相似率/%	近缘菌株名称		在克隆中比例 ³⁾ /%	图 1 中条带
			来源	登陆号		
SFCB2-1i ¹⁾	DQ399350	99.6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AF302116	—	9
SFCB2-2i	DQ399351	99.5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AI935258	—	2
SFCB2-4i	DQ399353	99.9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DQ199664	—	8
SFCB2-5i	DQ399354	99.5	<i>Lactobacillus paracasei</i> sub sp.	AB126872	—	
SFCB2-6c ²⁾	DQ486144	99.9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AF302116	60.1	
SFCB2-7c	DQ486145	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AI935258	20.3	
SFCB2-8c	DQ399356	99.7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LCE575812	2.0	
SFCB2-9c	DQ486146	99.9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DQ199664	3.4	
SFCB2-10c	DQ399355	99.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AF302116	2.7	
SFCB2-11c	DQ486147	99.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AF302116	3.4	
SFCB2-12c	DQ486148	99.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LCE575812	8.1	
Total					100.0	

1) i: 分离菌; 2) c: 克隆; 3) 在 148 个克隆中所占比率

2.3 SFC-2、分离菌的代谢产物

用 GC-MS 测定了 SFC-2 的第 25 代及其分离菌的 MRS-S 培养液的发酵产物 (表 2), 复合系 SFC-2 和分离菌 SFCB2-1i 在培养开始到 72 h 的培养期间始终检测到 L-(+) 乳酸、D-(-) 乳酸、乙酸和乙醇 4 种物质, 分离菌 SFCB2-2i 和 SFCB2-5i 的发酵产物中未见乙醇, SFCB2-4i 只在培养的第 24 h 和 48 h 生成少量乙醇, 分离菌 SFCB2-4i 和 SFCB2-5i 分别只在培养的第 24 h 和 12 h 生成少于 1 mg/mL 的 D-(-) 乳酸, 在 24 ~ 72 h 内生成大量的 L-(+) 乳酸. 可见复合系中的 L-(+) 乳酸主要来源于分离菌 SFCB2-4i 和 SFCB2-5i, D-(-) 乳酸主要来源于分离菌 SFCB2-1i 和 SFCB2-2i, 乙酸四者都有, 乙醇来源于 SFCB2-1i. 且复合系在 12 ~ 72h 内 L-(+) 乳酸的生成量皆大于各个分离菌的生成量, 并且大于 D-(-) 乳酸的生成量, 在有机酸中乳酸始终多于乙酸, 在发酵的第 12 h 时 D-(-) 乳酸生成量为 4.34 mg/mL, L-(+) 乳酸的生成量为 6.83 mg/mL, 占乳酸总生成量的 64%, 而乙酸生成量为 2.41 mg/mL, 乳酸与乙酸的比率为 4.63, 以后都有升高趋势, 48 h 后又逐渐下降. 乳酸和乙酸多有利于降低 pH, 乙醇和甘油有利于增加发酵饲料的风味, 而其他微量出现的醇类也是与风味有关的物质, 可提高饲料的嗜口性^[14]. 因此,

SFC-2 的发酵产物均有利于提高发酵饲料品质, 增加饲料的嗜口性, 没有发现影响饲料品质的成分.

表 2 复合系 SFC-2 第 25 代及其分离菌的发酵产物

Table 2 Fermented products of F25 of the SFC-2 and isolates during 72 h cultivation in MRS-S broth					
发酵产物	菌种	产物浓度/mg•mL ⁻¹			
		12 h	24 h	48 h	72 h
L-乳酸	SFC-2	6.83	7.25	7.94	7.22
	SFCB2-1i	3.32	1.88	2.05	0.12
	SFCB2-2i	— ¹⁾	2.14	1.43	3.02
	SFCB2-4i	—	1.79	6.54	6.01
	SFCB2-5i	—	6.39	6.79	1.38
D-乳酸	SFC-2	4.34	4.73	5.85	6.12
	SFCB2-1i	3.31	2.45	2.45	0.29
	SFCB2-2i	0.67	6.21	3.72	7.01
	SFCB2-4i	—	0.86	—	—
	SFCB2-5i	0.35	—	—	—
乙酸	SFC-2	2.41	4.69	5.03	5.03
	SFCB2-1i	6.31	5.10	4.40	2.27
	SFCB2-2i	1.70	2.48	2.13	2.52
	SFCB2-4i	2.29	2.22	2.40	2.22
	SFCB2-5i	1.47	1.98	1.68	1.48
乙醇	SFC-2	0.55	3.19	3.65	3.59
	SFCB2-1i	2.71	9.16	22.71	14.58
	SFCB2-2i	—	—	—	—
	SFCB2-4i	—	0.73	0.88	—
	SFCB2-5i	—	—	—	—

1) 表示没有检测到

2.4 SFC-2 接种于玉米干秸秆的发酵效果

将 SFC-2 接种于玉米秸秆发酵,其原材料及未接种、接种发酵 30 d 后化学成分变化如表 3 所示.从表 3 可以看出,相对于玉米秸秆原材料,发酵 30 d 后的发酵料其 pH 均有降低,且增加了乳酸含量,其中接种发酵料中乳酸含量较未接种的对照增加了 166.00%,粗蛋白含量提高了 2.24%,粗纤维含量降低了 6.68%.可见,接种后大大提高了乳酸含量,增加了饲料的嗜口性,同时使秸秆得到一定的软化,改善了饲料的发酵品质.

表 3 玉米秸秆发酵 30 d 前后化学成分分析(基于干物质基础)

Table 3 Chemical compositions of the corn straw before and after 30 days of fermentation (DM basis)

项目	原材料	对照	接种	增减率/%
pH	6.90	4.21	3.90	- 7.36
乳酸菌对数值/CFU·g ⁻¹	6.69	7.80	8.00	+ 2.56
乳酸/%	— ¹⁾	1.00	3.79	+ 166.00
可溶性糖/%	7.70	6.87	6.63	- 3.49
粗蛋白/%	6.77	6.70	6.85	+ 2.24
粗纤维/%	26.06	26.05	24.30	- 6.68
粗脂肪/%	0.38	0.39	0.36	- 7.69

1) 表示没有检测到

2.5 SFC-2 对不同温度及酸碱环境的耐性

SFC-2 能在 10 ~ 50℃ 温度范围内生长,其中在 30℃ 时生长最活跃,培养 24 h 时,其 D_{600} 接近 3.0, pH 最低,为 3.8, 15℃ 和 45℃ 培养时仍保持一定的生长量和低的 pH,而 10℃ 和 50℃ 培养时生长缓慢, pH 降低不显著,如图 2(a)(b). SFC-2 在 pH 3.0 ~ 8.0 范围内 24 h 的生长量 D_{600} 均超过 1.5,而在 pH 9.0 时生长较慢, D_{600} 只有 0.25 左右,如图 2(c).

2.6 SFC-2 的组成及保存稳定性

用 MRS-S 培养液 30℃ 静止培养,每 24 h 转接 1 次,连续继代 6 次,复合系仍保持旺盛的生长活力,可在 12 h 内 pH 降至 3.8 不变,并保持较高的产乳酸和乙酸的能力.用 PCR-DGGE 检测了其连续继代 6 代的菌种组成(图 3),结果其组成稳定,没有大的变化,其主要组成菌仍为 *L. plantarum*、*L. fermentum* 和 *L. paracasei*. 对菌种的保存用玉米粉和水稻秸秆粉为载体,制备了 SFC-2 菌制剂,并用晾干、风干、减压干和冷冻干燥的方法检验了菌种保存的稳定性,结果发酵后的乳酸菌制剂,乳酸含量可达 118 g/kg, pH 稳定在 3.8,且未发现酵母和霉菌的生长.

3 讨论

人们不断发现很多生物过程是单株微生物不能

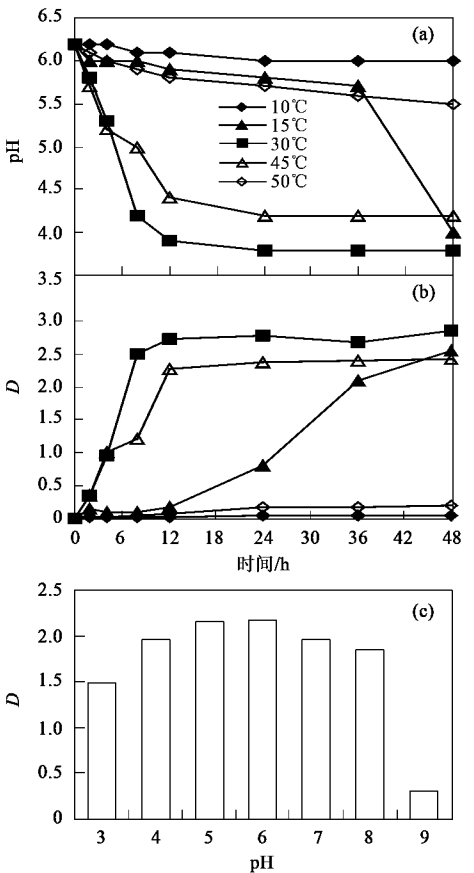
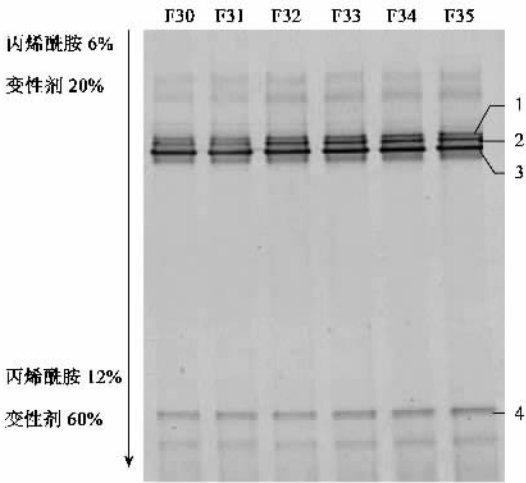


图 2 不同温度下 SFC-2 第 25 代在 MRS-S 培养液中 pH(a)和 D_{600} (b)的变化以及在不同 pH 下 D_{600} 的变化(c)

Fig.2 Changes of pH (a) and D_{600} (b) of F25 of the SFC-2 in MRS-S broth under different temperature, and changes of D_{600} under different pH(c)



条带 1,2: *L. plantarum*. 条带 3: *L. fermentum*. 条带 4: *L. paracasei*

图 3 SFC-2 复合系 F30 到 F35 在 MRS-S 培养液中培养 24 h 菌系组成的 PCR-DGGE 图谱

Fig.3 PCR-DGGE profiles of SFC-2 community from F30 to F35 after 24 h cultivation in MRS-S broth

单独完成,或只能微弱进行的,必须依靠 2 种或 2 种以上的微生物来共同完成^[15].因此本研究摆脱传统的纯培养方法,以自然菌群的组合为基础,迅速降低 pH,产乳酸多为指标,通过长限制性培养和定向驯化,得到功能和组成稳定的乳酸菌复合系.笔者采用该筛选方法也成功构建了高效稳定的木质纤维素分解菌复合系^[16,17].

关于饲料化发酵当前有很多报道,大多是单菌接种,如接种同型发酵乳酸菌 *L. plantarum*^[18,19] 或者 *L. casei*^[20],异型发酵乳杆菌如 *L. buchneri* 或者 *L. brevis*^[18~20],或者将两者简单结合^[19].单纯接种 *L. plantarum* 虽然可使发酵饲料最终 pH 降低,乳酸含量高,但对改善其有氧稳定性效果不明显,而单纯接种 *L. buchneri* 或 *L. brevis*,虽提高了有氧稳定性,抑制了有氧条件下的有机质损失,但乳酸含量较低,缺乏营养,将 2 种菌混合发酵,一定程度上可以保证营养和提高有氧稳定性.本实验筛选的复合系 16S rDNA 克隆文库中,76.3% 为 *L. fermentum* 的近缘种,20.3% 为 *L. plantarum* 的近缘种,3.4% 为 *L. paracasei* 的近缘种,异型发酵乳杆菌 *L. fermentum* 常在 Silage 中伴随一些异型发酵种,如 *L. ferintoshensis* 或者同型发酵菌 *L. casei* 或者 *L. paracasei* 出现,并产生乙酸和乳酸^[21]; *L. plantarum* 经常在青贮饲料中被作为同型发酵的接种剂使用; *L. casei* 作为同型发酵乳酸菌也常被接种于青贮饲料^[20].说明 SFC-2 中的组成菌均为青贮饲料中的有益菌,并且由于组成多样,其发酵性质稳定,对外界条件变化的适应性强.菌株间的相互协同功能有待进一步研究.

复合系 SFC-2 能在一定的温度范围和酸碱环境中生长,表现出对不同环境的耐性和适应性,且组成和保存稳定,便于在不同地区推广应用.

4 结论

(1)复合系 SFC-2 的主要组成菌为 *L. fermentum* 占 76.3%, *L. plantarum* 占 20.3%, *L. paracasei* 占 3.4%,均为乳酸杆菌.

(2) SFC-2 可在 12 h 内使 pH 降至 3.8,代谢产物中 L-(+)乳酸的生成量高于各个分离菌 L-(+)乳酸产量,高于 D-(-)乳酸生成量,高于乙酸.培养 24 h 时其乳酸生成量达 11.98 mg/mL,产乙酸达 4.69 mg/mL,乳酸与乙酸比率为 2.55.

(3) 该复合系 SFC-2 能在 15~45℃ 的温度范围和 pH 3.0~8.0 的酸碱环境中较好地生长,表现出

对环境的耐性,便于不同地区 and 环境的秸秆广泛应用.

致谢: 本研究在完成过程中得到了日本东京大学五十岚泰夫教授,石井正治副教授及春田伸博士,佐佐木建吾博士,加藤创一郎博士等的大力支持和帮助,在此致以诚挚的谢意.

参考文献:

[1] 中国农业年鉴编辑委员会. 中国农业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005. 177.

[2] 杨孝海. 秸秆禁烧与综合利用的问题与对策[J]. 甘肃农业, 2003, (8): 23.

[3] 闫红秋, 李霞. 焚烧农作物秸秆的危害及防止对策[J]. 云南环境科学, 2001, 20(2): 23~24.

[4] 郭庭双, Sanchez M D, 郭佩玉. 秸秆养畜-中国的经验[A]. 见: 联合国粮食及农业组织. 粮农组织家畜生产及卫生文集 149[C]. 罗马: 联合国粮食及农业组织, 2002. 186.

[5] Haruta S, Cui Z J, Huang Z Y, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 529~534.

[6] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 5278~5280.

[7] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695~700.

[8] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 5142~5150.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876~4882.

[11] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244~1245.

[12] Thomas T A. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage[J]. J Sci Food Agric, 1977, 28: 639~642.

[13] 朱燕, 夏玉宇. 饲料品质检验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 10~30.

[14] 高丽娟, 王小芬, 崔宗均, 等. 玉米、小麦、水稻秸秆自然发酵的生化变化[J]. 草地学报, 2005, 13(1): 47~52.

[15] 冯树, 张忠泽. 混合菌——一类值得重视的微生物资源[J]. 世界科技研究与发展, 2001, 22(3): 44~47.

[16] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 36~39.

[17]

Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al*. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**: 7099 ~ 7106.

[18]

Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, *et al*. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**: 562 ~ 567.

[19]

Filya I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages [J]. J Dairy Sci, 2003, **86**: 3575 ~ 3581.

[20]

Nishino N, Wada H, Yoshida M, *et al*. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri* [J]. J Dairy Sci, 2004, **87**: 2563 ~ 2570.

[21]

Sylvie V B, Fergus G P. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 297 ~ 305.



关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明.

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为.自 2006 年 5 月 1 日起,我们各刊在接受作者投稿时,要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果,文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分)未曾发表亦未曾投其它科技期刊.

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前,所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊.

我们将认真对待作者所作的上述承诺,并建立信息共享机制,对违背上上述承诺的作者(包括在文中署名的全体作者)采取联合行动.

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任.我们诚恳地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法,并积极宣传和配合.

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部