

玉米秸秆青贮过程中优势细菌多样性分析

包慧芳 王炜* 王宁 詹发强 赵忠润

(新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 通过从发酵 0、1、3、5、15、30 和 60 d 自然发酵的青贮玉米(CK)和采用菌剂处理的青贮玉米(处理 1)上取样, 分别进行 pH 值测定和菌群总 DNA 的提取。总 DNA 经纯化后采用引物 341F-GC 和 518R 进行细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增, 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离并回收优势条带和变化明显的条带进行测序分析, 了解秸秆饲料发酵过程中的优势细菌多样性及动态变化规律, 从而为现有青贮接种菌的改良奠定理论基础。研究结果表明: 采用菌剂处理的青贮玉米 pH 值下降更快, 其优势细菌种类更丰富, 且各优势菌的丰度比对照组中相应菌的丰度更强。

关键词: 青贮, 细菌, 多样性, 动态变化, DGGE

Diversity of Predominant Bacteria During Ensiling

BAO Hui-Fang WANG Wei* WANG Ning ZHAN Fa-Qiang ZHAO Zhong-Run

(Institute of Microbiology of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: To analyze the diversity and dynamic changes of predominant bacteria during ensiling, the silage fermented in natural and silage treated with inoculants, which named CK and unit 1 respectively, were sampled in the case of days 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60. The pH of each sample was measured and the genomic DNA of microorganism was extracted respectively. After purified by DNA gel Recovery kit, the genomic DNA was subjected to PCR with 16S rDNA (V3 region) primers (341F-GC and 518R). The amplified DNA fragments were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the dominant bands were excised for sequence analysis. The results showed that the pH of unit 1 dropped more rapidly than that of CK, the species of predominant bacteria and numbers of each species also more abundant.

Keywords: Ensiling, Bacteria, Diversity, Dynamic changes, DGGE

我国每年各种作物秸秆达7亿吨以上, 占世界秸秆总产量的20%–30%, 且种类多, 是饲喂家畜重要的非粮饲料来源^[1-2]。但资料表明用作饲料的秸秆不足秸秆产量的10%^[3], 若能对其进行充分开发利

用, 将为缓解“粮食、能源、环境”三大危机, 实现农业可持续发展做出重要贡献。青贮技术是有效利用秸秆资源的重要途径, 青饲料在青贮过程中, 营养物质损失较少, 蛋白质胡萝卜素营养物损失更少,

基金项目: 国家 973 计划子课题(No. 2004CB719704); 新疆自治区高技术研究发展计划(No. 200511107); 新疆自治区科研院所改革与发展专项资金项目(No. 200818)

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-991-4534829; ✉ whangwei0718@126.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-02-01; 接受日期: 2010-04-07

因此,能提高饲料的适口性和消化率^[4]。青贮饲料的“过腹增值”延长了产业链条,将种植业与养殖业有机结合起来,也带动了农民增收。目前我国各级政府和广大奶牛养殖户已经逐渐认识到青贮饲料对于发展奶牛养殖业的重要性,并采取了一系列措施大力推广科学饲养技术,扩大青贮饲料生产。

青贮接种菌(Silage inoculant bacteria)是专门用于饲料青贮的一类微生物添加剂,由1种或1种以上乳酸菌、酶和一些营养体组成,主要作用是调节青贮料内微生物区系,调控青贮发酵过程,促进乳酸菌大量繁殖,更快地产生乳酸,使饲料的pH值下降到4.2以下,来抑制有害菌的繁殖,并促进多糖与粗纤维的转化,从而有效地提高青贮饲料的质量。目前,有关添加剂在青贮技术中的应用已有较多研究^[5-7],但有关青贮饲料发酵过程中微生物动态变化规律报道较少。

PCR-DGGE是一种能够在分子水平上进行微生物多样性研究的DNA指纹图谱技术,由Fischer等于1983年提出并用于检测点突变,Muyzer等在1993年首次将其应用于微生物群落结构研究^[8],目前已发展成为环境生物群落结构分析研究的主要手段之一^[9-11]。本研究通过采用PCR-DGGE技术对玉米青贮过程中细菌多样性进行研究,从而了解青贮饲料发酵过程中微生物动态变化规律,为现有青贮接种菌的改良奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: DNA回收试剂盒为BioDev-Tech Gel Extraction System B, PCR扩增引物由TaKaRa公司合成, PCR反应试剂和克隆载体pMD19-T购自TaKaRa公司, DGGE及银染相关试剂均购自上海生工公司,测序由上海生工公司完成。

pH计为Sartorius PB-10, DGGE仪为C.B.S. DGGE-2001-Rev.B, PCR仪为Eppendorf Mastercycler® ep,离心机为Eppendorf Centrifuge 5417R。

1.1.2 菌剂: 本研究所用青贮接种菌包括*Lactococcus plantarum* (LP, 植物乳杆菌)、*Bacillus licheniformis* (BL, 地衣芽孢杆菌)和*Candida utilis* (CU, 产朊假丝酵母), 其中*Lactococcus plantarum*、*Candida utilis*通过引进后诱变筛选获得, *Bacillus*

*licheniformis*为本研究组从秸秆饲料上分离筛选获得。

1.2 方法

1.2.1 青贮饲料的制作及取样: 以生长4个月的全株玉米秸秆为材料,切割成3 cm-5 cm进行青贮。青贮分两个处理,分别为CK和处理1。CK不添加任何菌剂,处理1采用现有菌剂(LP、BL、CU以一定比例配伍)处理。两个处理分别取第0、1、3、5、15、30和60天的样品进行pH测定及DGGE分析。

1.2.2 pH测定: 按照上述时间称取青贮饲料10 g,用100 mL蒸馏水充分洗涤样品, pH计测定pH值。

1.2.3 青贮饲料菌群总DNA提取: 按照上述时间称取青贮饲料10 g,加入50 mL蒸馏水,超声波洗涤样品,离心回收菌体,采用土壤总DNA提取方法提取DNA^[12],电泳检测DNA并采用回收试剂盒回收。

1.2.4 16S rDNA V3区域的PCR: 用于DGGE分析的PCR产物扩增区域是16S rDNA的可变区V3区。以上述总DNA为模板,以341F-GC (5'-CGCCCGC CGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG GCCTACGGGAGGCAGCGA-3')和518R (5'-ATTAC CGCGGCTGCTGG-3')为引物进行PCR扩增^[13]。PCR反应体系为: 10 × PCR Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL, dNTPs (各2.5 mmol/L) 4 μL, Taq酶0.25 μL, 引物(20 μmol/L)各1 μL, 模板1 μL, ddH₂O 33.75 μL; PCR反应条件为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 30个循环; 72°C 10 min。PCR扩增产物以2.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 DGGE分析: 对16S rDNA V3区域的PCR扩增产物进行DGGE分析。DGGE的胶浓度为8%,变性剂梯度为40%-60% (100%的变性剂浓度为: 尿素7 mol/L、甲酰胺40%), 65°C恒温, 80V电压电泳12 h。电泳完毕采用银染方法染色,成像。

1.2.6 测序和分析: 同样采用上述方法进行DGGE, EB染色, 染色完毕将优势条带和变化较明显的条带从DGGE电泳胶上切割下来,回收DNA并以此为模板,以不带GC夹板的引物341F和518R分别进行PCR扩增,回收扩增产物克隆至pMD19-T载体上进行测序。所测得的序列在GenBank数据库中进行BLAST比对分析(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。采用MEGA软件绘制进化树。

2 结果与分析

2.1 青贮过程中 pH 值测定

按照上述时间称取青贮饲料 10 g, 用 100 mL 蒸馏水充分洗涤样品, pH 计测定 pH 值。测定结果见图 1。从图 1 可以看出, 处理 1 pH 值下降比 CK 要快。处理 1 pH 值第 5 天之后变化不大, 基本趋于稳定, 第 15 天达到 3.72, 在第 15–30 天之间 pH 值略有上升, 之后又出现下降。而 CK pH 值在第 30 天左右才降至 3.78。分析其原因, 可能是因为当 pH 值降到一定程度, 抑制了产朊假丝酵母和部分乳酸菌的生长, 所以 pH 值出现上升, 当 pH 上升至一定程度, 产朊假丝酵母和部分乳酸菌又能继续生长, 所以 pH 值又呈下降。

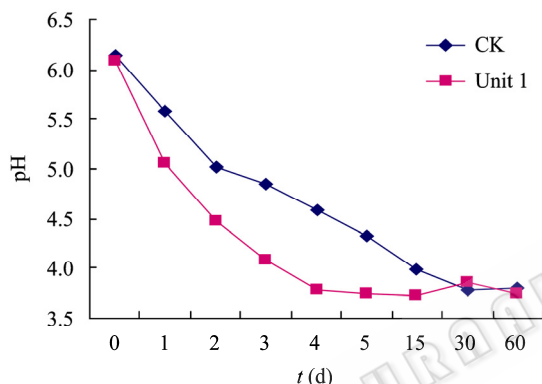


图 1 青贮过程中 pH 值测定结果
Fig. 1 Changes of pH during ensiling

2.2 菌群总 DNA 提取及 16S rDNA V3 区域的 PCR

按照 1.2.3 和 1.2.4 所述方法进行菌群总 DNA 提取及 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增, 并分别进行 0.8% 和 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (电泳结果见图 2 和图 3)。研究表明, 细菌基因组 DNA 大小约为 23 kb, 细菌 16S rDNA V3 区长度约为 200 bp (由于本试验 PCR 引物带 GC 夹板, 所以其理论值约为 240 bp)。从图 2 可以看出, 在 23 kb 处有目的条带, 说明菌群基因组 DNA 提取成功; 从图 3 可以得知, 大约在 240 bp 处有目的条带, 说明所用引物及 PCR 程序均适合本样品。

2.3 DGGE 分析

按照 1.2.5 所述方法进行 DGGE 电泳, 电泳结果见图 4 和图 5 所示。

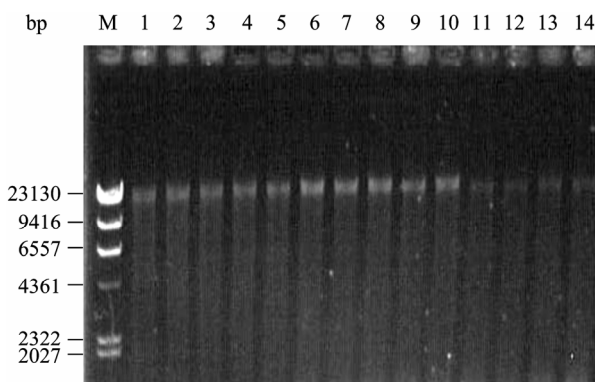


图 2 菌群总 DNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA

Note: M: λ DNA/Hind III Marker; 1–7: 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 d of CK; 8–14: 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 d of unit 1.



图 3 16S rDNA V3 区 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR of 16S rDNA (V3 region)

Note: M: 50 bp DNA Ladder; 1–7: 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 d of CK; 8–14: 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 d of unit 1; 15: CK⁻.

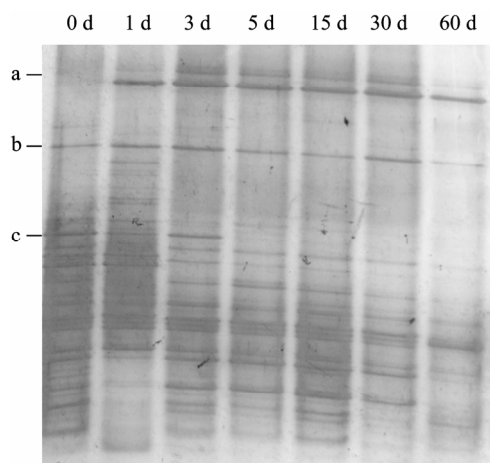


图 4 对照玉米发酵过程中细菌动态变化 DGGE 电泳图

Fig. 4 DGGE profile of bacteria shifts of CK

从 DGGE 电泳照片可以看出, 秸秆饲料在整个发酵过程中细菌种类是比较丰富的, 大约有 30 多种。在 CK 中, 主要优势菌和变化较明显的菌有 a、

b、c。其中 a 从第 1 天至第 60 天持续存在; b 从第 0 天至第 30 天存在, 30 d 后减弱; c 从第 0 天存在, 第 3 天之后减弱至消失; 在处理 1 中, 主要优势菌和变化较明显的菌有 A、B、C、D、E、F。其中 A 和 B 均持续存在于整个检测期内; C 从第 0 天存在, 第 3 天之后减弱; D 从第 0 天至第 60 天持续存在, 但亮度比 A、B 稍弱; E 从第 0 天存在, 第 3 天之后变弱, 5 d 之后消失; F 从第 3 天开始出现, 之后逐渐增强。由图 4、图 5 横向比较可以看出: 采用菌剂处理的青贮饲料, 其优势菌种类更丰富, 而且各优势菌的丰度比对照组中相应菌的丰度更强。

回收上述优势条带和变化较明显的条带进行测序分析, 所测得的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析并绘制进化树, 结果如图 6。进化树结果表明: a/A 为 *Lactococcus plantarum*、b/B 为 *Pediococcus pentosaceus*、c/C 为 *Bacillus licheniformis*、D 为 *Enterococcus faecium*、E 为 *Streptococcus macedonicus*、F 为 *Lactococcus lactis*。

formis、D 为 *Enterococcus faecium*、E 为 *Streptococcus macedonicus*、F 为 *Lactococcus lactis*。

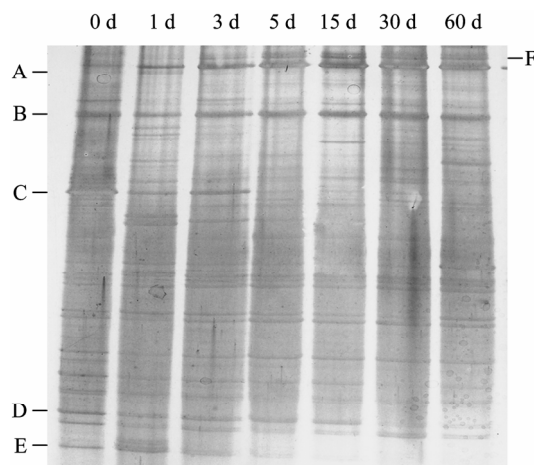


图 5 处理 1 发酵过程中细菌动态变化 DGGE 电泳图
Fig. 5 DGGE profile of bacteria shifts of unit 1

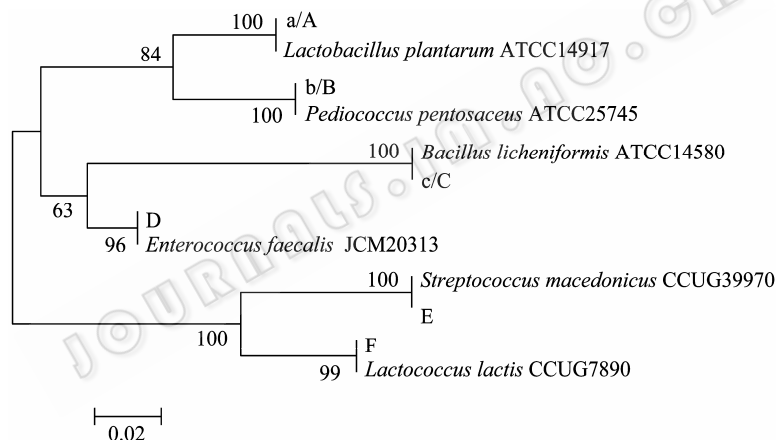


图 6 玉米青贮过程中优势细菌进化树
Fig. 6 The cladogram of bacteria predominant during ensiling

3 讨论

3.1 从表 1 可以看出, 处理 1 比 CK pH 值下降要快, 说明添加青贮接种菌确实能使 pH 值迅速下降, 从而抑制有害菌生长, 达到保存青贮品质的目的。

3.2 采用 DGGE 方法进行微生物多样性分析时, 如何保证微生物种群结构的完整性是关键之一。由于本试验研究对象为秸秆饲料, 其上附着的微生物难以洗脱下来, 本研究采用了超声波洗涤的方法, 确保微生物种群结构的完整性, 从而真实地反映秸秆饲料发酵过程中细菌的多样性。

3.3 从 DGGE 电泳结果可以看出, 玉米青贮过程中

细菌种类很多, 但由于其中大部分为杂菌, 它们在整个青贮过程中始终存在但量比较少, 而且前后没有太多变化, 对青贮品质也没有太大影响, 所以本研究只选择了其中的优势条带和变化较明显的条带进行了测序分析。结果表明, 青贮饲料发酵过程中优势菌主要有 *Lactococcus plantarum*、*Pediococcus pentosaceus* 和 *Lactococcus lactis*, 进行菌剂配伍改良时, 可考虑适当增加这几种菌的比例。

3.4 根据 DGGE 原理, 理论上迁移到同一位置的片段序列相同, 那么不同的条带就应代表不同的物种, 但由于嵌合体、共迁移、异源双链体等会导致结果偏差; 另外, 由于 DGGE 只能对微生物群落中数量

大于 1% 的种群进行分析, 而且用于 DGGE 分析的片段长度有限, 也可能导致结果会出现误差, 所以本研究组将结合构建文库等方法进一步验证秸秆饲料发酵过程中微生物细菌多样性, 同时对酵母多样性进行探索。

参 考 文 献

- [1] 宋萍, 曹杰, 于军, 等. 秸秆饲料的加工技术及应用研究. 河北农业科学, 2008, 12(7): 76-78.
- [2] 曹稳根, 高贵珍, 方雪梅, 等. 我国农作物秸秆资源及其利用现状. 宿州学院学报, 2007, 22(6): 110-112.
- [3] 江平. 秸秆饲料的营养特点及利用. 四川畜牧兽医, 2004, 31(11): 5-6.
- [4] 王凤幸, 王凤璐, 李西康, 等. 秸秆饲料加工调制技术的重大发展. 畜牧兽医科技信息, 2008(10): 11-12.
- [5] 顾锡慧, 杨翔华, 马学良, 等. 青贮添加剂研究进展. 辽宁石油化工大学学报, 2004, 24(3): 28-31.
- [6] Hua JL, Zhang YG, Men YX. Effect of lactic acid bacterial inoculants on rice straw silage. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 15(1): 38-42.
- [7] Wang JH, Wu ZL, Michae IW, *et al.* A study on the effect of the bacterial inoculant on corn silage quality, digestibility and performance in dairy cattle. *High Technology Letters*, 2005, 11(2): 211-216.
- [8] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993(59): 695-700.
- [9] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. DGGE、T-RFLP、LH-PCR 对两种活性污泥的微生物种群多样性分析的比较. 环境工程学报, 2009, 3(8): 1365-1370.
- [10] Ying YL, Lv ZM, Min H, *et al.* Dynamic changes of microbial community diversity in a photohydrogen producing reactor monitored by PCR-DGGE. *Journal of Environmental Sciences*, 2008(9): 1118-1125.
- [11] Akihito E, Sanae O. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-DGGE gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(3): 216-221.
- [12] 黄进勇, 岳彩鹏, 周伟. 麦田土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. 河南农业大学学报, 2007, 41(4): 396-400.
- [13] 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. 基于不同引物的湖泊沉积物中细菌群落结构多样性的比较研究. 南京大学学报: 自然科学版, 2008, 44(3): 289-296.

征订启事

《腐植酸》杂志 2010 年征订启事

《腐植酸》杂志于 1979 年创刊, 由中国腐植酸工业协会主办, 是全国唯一的腐植酸类专业科技期刊, 面向国内外公开发行人。《腐植酸》杂志是《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》入编期刊。本刊为国际标准大 16 开, 内设 60 页, 主要栏目有: “卷首语”“专题评述”“研究论文”“译文”“腐植酸质量检测”“协会(专业)标准讨论”“腐植酸文摘”“腐植酸专利简介”“腐植酸环保应用”“两会”动态”“信息传真”““乌金杯”采风”“腐植酸文献检索”等。

《腐植酸》杂志集学术性、专业性和实用性于一身, 内容广泛、指导性强、信息量大, 自 1979 年创刊以来, 受到广大读者的关注与好评。2010 年, 本刊将继续以“高扬绿色 关注民生”为指导, 设置丰富的内容, 为推动我国腐植酸产业的发展做好服务工作!

《腐植酸》杂志为双月刊, 国际刊号: ISSN1671-9212; 国内刊号: CN11-4736/TQ。每期定价 20.00 元, 全年 6 期, 年定价 120.00 元(含邮费)。

热诚欢迎各位新、老读者及时订阅! 如需过刊, 请直接与编辑部联系。

订购方式: 从邮局汇款至编辑部。

地 址: 北京市西城区六铺炕街 1 号 邮编: 100120

收件人: 《腐植酸》编辑部

电 话: 010-82784950, 010-82035180

传 真: 010-82784970

E-mail: chaia@126.com

网 址: www.chinaha.org