

# 玉米青贮过程中乳酸菌动态变化

詹发强<sup>1,2</sup> 包慧芳<sup>2</sup> 崔卫东<sup>2</sup> 王炜<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学农业生物技术重点实验室 新疆 石河子 832003)

(2. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘要:** 为了揭示青贮玉米在发酵过程中乳酸菌数量及种群的动态变化, 以及微生物添加剂对乳酸菌种群变化的影响, 采用了培养方法计数发酵过程中乳酸菌数目的变化, 利用 16S rRNA 基因序列比对方法分析青贮玉米中乳酸菌的多样性及种群变化趋势。经过对 15 d 时间内青贮玉米中乳酸菌变化趋势的分析显示: 一周后对照组乳酸菌数最高达到  $2.1 \times 10^6$  CFU/g, 两处理组中处理组 II 乳酸菌数达到最高  $5.5 \times 10^7$  CFU/g; 利用 MRS 平板分离、培养出典型乳酸菌菌落 152 株, 经 16S rRNA 基因序列比对分析为乳杆菌属和片球菌属, 其中 86% 的菌株属于乳杆菌属。此研究表明微生物添加剂有利于青贮玉米发酵过程中乳酸菌的快速增殖, 乳杆菌属和片球菌属都是青贮玉米发酵的启动菌之一, 在发酵前期一直存在, 但发酵后期乳杆菌属是玉米青贮过程中乳酸菌的主要菌群。

**关键词:** 青贮玉米, 乳酸菌, 动态变化

## Dynamic Changes of Lactic Acid Bacteria During a 15-Day Ensilage of Corn

ZHAN Fa-Qiang<sup>1,2</sup> BAO Hui-Fang<sup>2</sup> CUI Wei-Dong<sup>2</sup> WANG Wei<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Agricultural Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

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

**Abstract:** To analyze the dynamic changes of LAB (Lactic acid bacteria) during a 15-day ensilage of corn and the effect that came from inoculants. Plate isolation and 16S rRNA gene homology methods were used to take count of LAB numbers and analyze the population changes during ensilage of corn. One hundred and fifty two LAB were identified as species of *Lactobacillus* and *Pediococcus* which were isolated from fermented corn, whereas 86% colonies were identified as *Lactobacillus* by 16S rRNA gene sequence analysis. The maximum numbers of control group in fermented corn achieved  $2.1 \times 10^6$  CFU/g and the second experimental group in fermented corn achieved  $5.5 \times 10^7$  CFU/g after a week. It accelerated growth of *Lactobacillus* when microbial additive was added. The initial bacteria during ensilage of corn were *Pediococcus* and *Lactobacillus*, the dominant bacterium was *Lactobacillus* in the later phase.

**Keywords:** Ensilage of corn, LAB, Dynamic changes

青贮玉米是饲喂家畜重要的粗饲料之一, 如何提高青贮玉米的营养品质, 完整保存青贮玉米的营养价值等问题一直以来都是研究的热点之一。青贮饲料质量的好坏同它所含有的乳酸菌有很大的关系<sup>[1]</sup>, 尤其是对发酵品质有重要影响的微生物体系, 更是研究者关注的焦点<sup>[2]</sup>。乳酸菌是一类能在可利用的碳水化合物发酵过程中产生大量乳酸的细菌, 这类细菌广泛存在于土壤、植物根、茎、湖泊及人与动物的体内<sup>[3]</sup>。同样青贮饲料品质的优劣直接取决于乳酸菌的增殖与变化, 发酵初期, 乳酸菌和大肠菌群开始增殖, 随着 pH 的逐渐下降和厌氧程度的加强, 乳酸菌在数量上逐渐形成绝对优势, 其他微生物的生长受到抑制, 乳酸菌产生大量乳酸, 使 pH 进一步下降, 其他微生物的活性进一步减弱, 当 pH 下降到一定程度以后, 乳杆菌的活动也受到了抑制<sup>[4]</sup>。有研究表明添加乳酸菌制剂是改善青贮饲料品质的有效措施<sup>[5]</sup>, 筛选出具有优良特性, 符合青贮发酵规律, 与野生菌能友好兼容、相互促进的乳酸菌一直以来是大家研究的重点之一。现如今采用 16S rRNA 来鉴定细菌被公认为是有效且可靠的分子分型方法, 目前已得到广泛的应用<sup>[6-8]</sup>。

本研究以乳熟期玉米为材料制作瓶装青贮, 设置对照组与两个不同处理组来观察微生物添加剂对青贮玉米发酵过程中乳酸菌的影响, 以及乳酸菌在青贮玉米发酵过程中的生长及变化情况, 进一步揭示青贮玉米在发酵过程中乳酸菌数量及种群的动态变化, 以及微生物添加剂对乳酸菌种群变化的影响, 为今后微生物添加剂的优化, 有益菌群的筛选, 较为完整保存青贮玉米的营养价值等具有积极意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与方法

**1.1.1 材料:** 以乳熟期玉米为材料, 粉碎, 制作瓶装青贮。设空白对照组(CK), 只喷洒 1% 的 NaCl 溶液; 处理 I: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*-2): 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*-2): 产朊假丝酵母(*Candida utilis*-3) = (1:1:1, 重量比); 处理 II: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*-2): 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*-2): 产朊假丝酵母(*Candida utilis*-3) = (2:1:1, 重量比); 以添加量 0.01 g/kg 分别溶于 1% 的 NaCl 溶液中, 均匀喷洒拌匀, 压实密封放置

于室温; 菌种均为真空冷冻干燥后的干粉, 由新疆农业科学院微生物应用研究所保存。

**1.1.2 培养基:** MRS 培养基<sup>[9]</sup>: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 乙酸钠 5 g, 柠檬酸二铵 2 g, 吐温 80 1 mL, 硫酸镁 0.58 g, 硫酸锰 0.05 g, 磷酸氢二钾 2 g, 琼脂 15-17 g, 水 1000 mL。灭菌前 pH 调至 6.12-6.20。1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。碳酸钙的添加量 2%, 碳酸钙单独干热灭菌(160°C, 2 h)。

**1.1.3 仪器与试剂:** MSSPX-250 型生化培养箱, SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台, MLS-3020 高压蒸汽灭菌锅, E360K 离心机, 恒温摇床 HWY-100。PCR 仪 Eppendorf No: 5345, 电泳仪 Bio-Rad Model 200/2.0, 凝胶成像仪 United-Bio, GK-330C plus, 恒温水浴锅, 限制性内切酶 *Hinf* I 及 PCR 预混液 (TaKaRa Biotechnology), 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株分离培养方法:** 在无菌操作台称取青贮玉米样品 10 g, 置于装有 90 mL 无菌水的三角瓶中浸泡 30 min, 然后用无菌水进行 10<sup>-1</sup> 到 10<sup>-5</sup> 梯度稀释, 选 10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup> 三个稀释度, 每个稀释度取 0.1 mL 分别涂布于 MRS 平板培养基上, 每个做 3 个重复, 在 30°C 下培养 24-72 h, 取菌落数在 30-300 之间的平板作为有效计数平板, 然后挑取每个不同处理中的典型菌落, 分纯后备用。菌落数目多重比较采用 DPS 3.01 软件。

**1.2.2 16S rRNA 序列扩增及其测序:** 挑取少量单菌落, 放入盛有 25 μL 无菌水的 EP 管中, 100°C 煮沸 8-10 min, 后迅速放入冰水混合物中 5 min。离心 10000 r/min、5 min, 4°C 保存, 用时取上清<sup>[10]</sup>。PCR 扩增乳酸菌 16S rRNA 序列。引物 1(27F): 5'-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3'; 引物 2(1492R): 5'-CAA ACTTGGTCATTAGAGGA-3'。PCR 扩增反应体系为 50 μL, 含有 24 μL premix Taq, 引物 1 1 μL, 引物 2 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 24 μL。扩增条件: 94°C 4 min; 94°C 55 s, 53°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 7 min。扩增产物(约 1600 bp)经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, PCR 产物直接进行双向测序, 测序由北京六合华大基因生物工程有限公司完成。

**1.2.3 酶切分型及电泳:** 限制性内切酶 *Hinf* I 酶切分型: 酶切体系: 10 × M buffer 2 μL, *Hinf* I 0.5 μL,

16S rRNA PCR 扩增产物 20  $\mu$ L, 37°C 水浴, 过夜酶切。电泳分型: 100 V, 45 min, 琼脂糖凝胶浓度 3%。酶切分型后, 根据条带的数目及大小不同, 利用 LabImage 软件计算条带碱基数, 利用统计软件 DPS 3.01 进行聚类。

**1.2.4 16S rRNA 序列比对及系统发育分析:** 将测序得到的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 分析, 从中获取相近的 16S rRNA 序列, 用 ClustalX 软件和 MEGA 4.1 中的 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同取样时间各样品中乳酸菌数目的变化

由图 1 可见, 随着时间的推移, 青贮发酵玉米中乳酸菌的数目在逐渐增加, 从第 2 天到发酵的第 7 天, 青贮玉米中可培养乳酸菌的数目增加了 1 个数

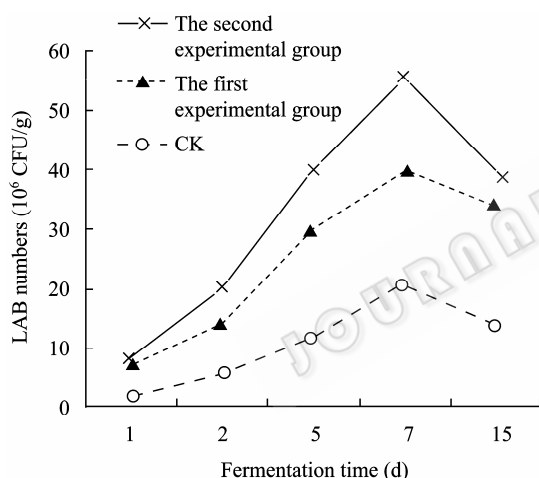


图 1 不同处理乳酸菌增殖曲线

Fig. 1 LAB proliferate curve of different treatment

量级, 均达到  $10^7$  CFU/g。至发酵的第 15 天, 乳酸菌的数量有所降低, 其中对照组下降趋势比较明显, 说明发酵的前 15 天时间是乳酸菌快速增殖期, 也是玉米青贮过程中乳酸菌数目达到最大的主要时间段, 对于青贮质量的好坏, 品质的优劣, 具有至关重要的作用。乳酸菌数目在发酵 1 周后均达到极值, 多重比较显示在 5% 水平乳酸菌数目处理组 II 与对照组差异显著, 处理组 I 与处理组 II、对照组之间差异不显著。但处理组 II 与处理组 I 乳酸菌数目均高于对照组表明, 在添加乳酸菌复合添加剂后, 有助于青贮玉米中乳酸菌数目的快速增加。

### 2.2 菌落 PCR 及酶切结果

青贮玉米中可培养乳酸菌 16S rRNA PCR 鉴定结果。如图 2 所示, RS-1-RS-24 条带反映了来自部分挑取菌落的 16S rRNA 测试结果, 均为乳酸菌; 所扩增的样品整齐度较高, 与预计大小相当, 目标条带清晰, 无杂带, 共扩增从不同处理中挑取的典型菌落 152 株。

限制性内切酶 *Hinf* I 酶切分型后电泳结果如图 3 所示, RS-3-RS-94 为限制性内切酶 *Hinf* I 酶切后的部分电泳结果, 根据条带的数目及大小不同, 利用 LabImage 软件计算条带大小, 利用 DPS 3.01 软件进行聚类分析, 归类为 18 个不同的类型。

### 2.3 系统发育分析

构建进化树分析(图 4)表明, 青贮玉米中的可培养乳酸菌集中于 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus*, 且乳杆菌属的操作单元多于片球菌属, 占总类型中的 56%, 乳杆菌主要集中在 *Lactobacillus arizonensis*、*Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus delbrueckii* 等, 片球菌主要以 *Pediococcus pentosaceus* 为主。

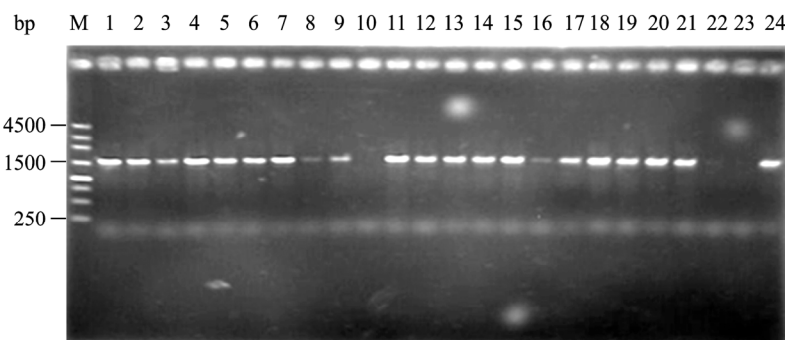


图 2 菌落 16S rRNA PCR 结果

Fig. 2 The result of 16S rRNA PCR colony

Note: M: DNA marker; 1-24: Samples.

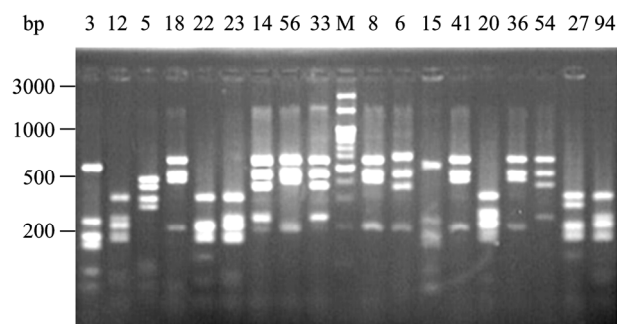


图3 限制性内切酶 *Hinf* I 酶切分型图

Fig. 3 The digestion typing of restriction enzyme *Hinf* I enzymatic

Note: M: 100 bp ladder DNA marker; 3-94: Samples.

## 2.4 不同处理中乳酸菌随时间的变化

微生物添加剂对于发酵后期乳杆菌的增加趋势明显(图5), 乳杆菌的生长与片球菌的生长呈反联动效应, 只有对照组片球菌后期有明显生长趋势, 其余处理组在后期片球菌几乎所占比例为零。分析原因可能是青贮添加剂的添加加速了青贮发酵的过程, 致使片球菌被优势菌乳杆菌所快速取代, 而对对照组的乳杆菌在同样取样时间内并未达到处理组的效果, 也就是说青贮微生物添加剂可以促进乳杆菌的快速生长。分离出的乳酸菌菌株全部集中在乳杆菌属(*Lactobacillus*)和片球菌属(*Pediococcus*), 其

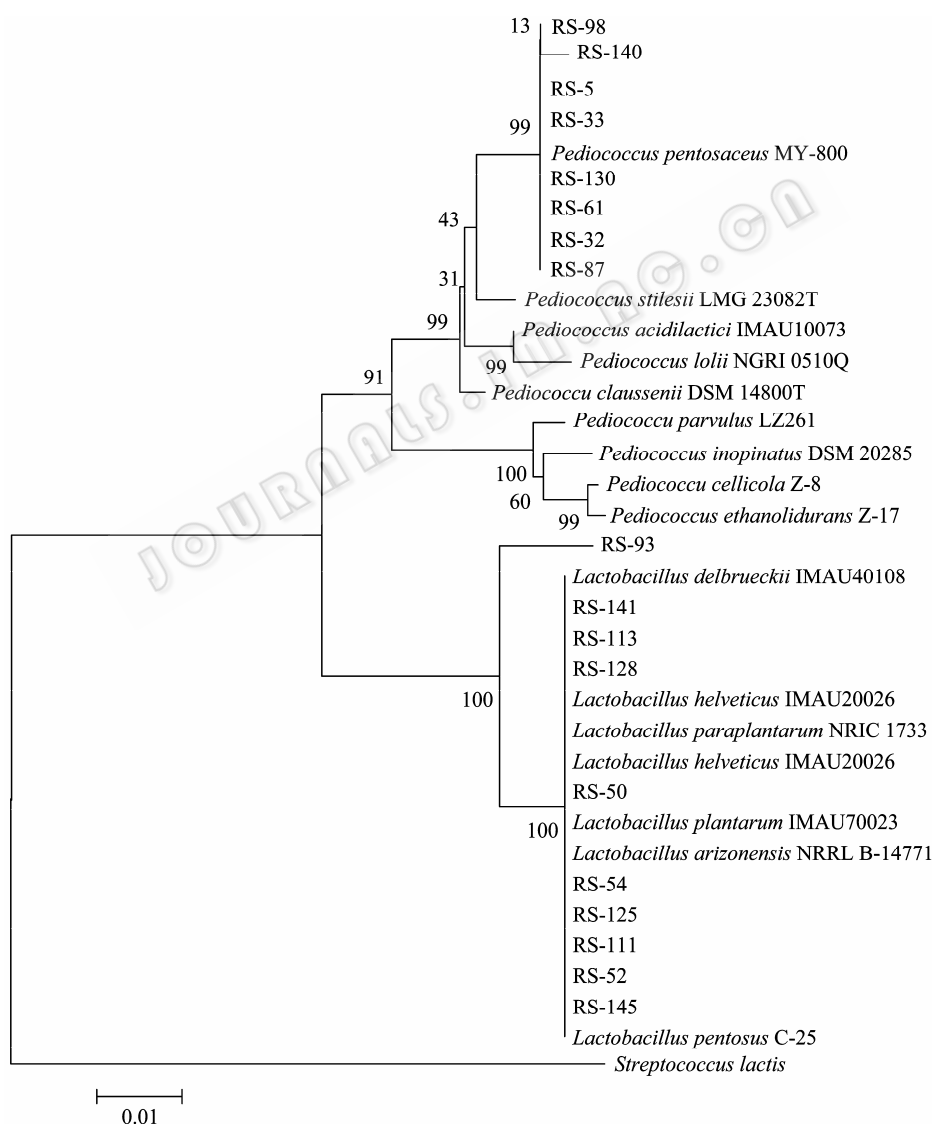


图4 乳酸菌进化树

Fig. 4 16S rRNA cladogram of LAB

Note: Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). The sequence of *Streptococcus lactis* was used as an outgroup. Bar 1% sequence divergence. RS- means colony serial number.

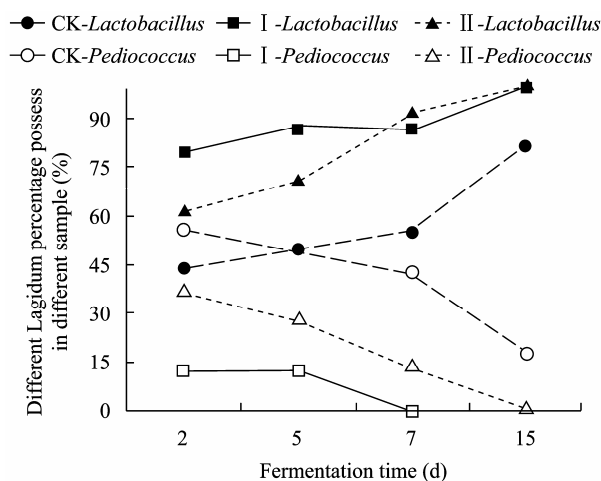


图5 青贮玉米中不同属乳酸菌变化趋势

Fig. 5 LAB dynamic changes curve of different genera in ensilage of corn

中86%的菌株属于乳杆菌属,且前期两者均有生长,后期主要是乳杆菌属。乳杆菌数目多重比较显示在5%水平处理组 I-*Lactobacillus* 与对照组 CK-*Lactobacillus* 差异显著,处理组 II-*Lactobacillus* 与对照组 CK-*Lactobacillus*、I-*Lactobacillus* 之间差异不显著,说明添加剂中植物乳杆菌的增加并没有特别显著影响发酵过程中乳杆菌的变化趋势,一定的添加量已经能够起到促进发酵,促进乳杆菌生长的作用。

### 3 结论

(1) 微生物添加剂有利于青贮玉米中乳酸菌的快速增值,分析表明 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus* 都是青贮玉米发酵的启动菌之一,在发酵前期的体系中一直存在,但发酵后期乳杆菌属是青贮玉米中乳酸菌的主要菌群。

(2) 乳酸菌16S rRNA 序列分析表明,青贮玉米发酵过程的15 d内乳酸菌主要集中在乳杆菌属和片球菌属,从得到的酶切类型分析,其中56%的操作单元属于乳杆菌属,最终乳杆菌属占到发酵体系中乳酸菌数目的86%。

(3) 微生物添加剂中植物乳杆菌含量的增加并没有显著影响发酵过程中乳杆菌的变化趋势,说明一定的添加量已经起到促进发酵,促进乳酸菌生长的作用。因此,添加剂中菌剂的配伍也是今后研究的方向之一,以期达到经济、高效的菌剂配伍,对于缩短发酵周期,提高青贮玉米质量,完整保存玉米青贮营养成分具有一定的意义。

### 参考文献

- [1] 王国仓,李增辉,范秀兰. 微生物在青贮饲料中的作用. 内蒙古畜牧科学, 2003(3): 55-56.
- [2] 韩吉雨,王海荣,侯先志,等. PCR-DGGE 方法分析玉米及苜蓿青贮动态发酵体系中菌群多样性. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8888-8892.
- [3] 刘飞,杨丽杰,侯俊财,等. 青贮饲料中优良乳酸菌的分离鉴定. 饲料工业, 2005, 26(24): 12-14.
- [4] 贾朋辉,郭洪新,李国军,等. 微生态发酵饲料菌群变化及其应用. 饲料博览: 技术版, 2009(3): 24-27.
- [5] 王小芬,高丽娟,杨洪岩,等. 苜蓿青贮用乳酸菌复合系 A12 的组成多样性. 微生物学报, 2006, 46(5): 767-772.
- [6] Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3450-3454.
- [7] Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Design*, 2003, 9(2): 175-191.
- [8] Vaneechoutte, Roseau MR, Devos P, et al. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 93(3): 227-234.
- [9] 凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85.
- [10] 李国媛. 秸秆腐熟菌剂的细菌种群分析及其腐熟过程的动态研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.