

3种青贮饲料中乳酸菌群落结构特征分析及优良乳酸菌的筛选

李彦飞¹, 初晓辉¹, 王文², 杨双双¹, 马向丽^{1,3}, 段新慧^{1,3}, 单贵莲^{1,3*}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省种羊繁育推广中心, 云南 昆明 652042; 3. 云南省高原特色农业产业研究院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】研发出适应昆明气候条件的青贮用乳酸菌制剂, 促进当地草地畜牧业的高效发展。【方法】以自然发酵60 d的全株玉米(*Zea mays*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和鸭茅(*Dactylis glomerata*)3种青贮饲料为试验材料筛选优良乳酸菌, 经继代培养获得83株天然乳酸菌(*Lacticacid bacteria*, LAB)菌株。测定83株乳酸菌形态特征及构建系统发育树。【结果】获得的83株天然乳酸菌中, 昆明地区青贮饲料最常见的乳酸菌是植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 占50.6%; 其次是戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和短乳杆菌(*L. brevis*), 各占21.7%。根据乳酸菌的生长活性和产酸能力, 进一步从83株菌株筛选出3株优质乳酸菌(B10、B16、C23)。【结论】生理生化特性和16S rRNA测序分析显示, B10、B16、C23分别为短乳杆菌、植物乳杆菌和戊糖片球菌。3菌株产酸速率和生长速率的高低顺序为B16>C23>B10。

关键词:青贮饲料; 乳酸菌; 形态特征; 系统发育树

中图分类号:S816 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)02-0059-08

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2023.02.007



青贮是在厌氧环境中, 利用乳酸菌的发酵作用, 降低pH, 抑制有害菌的生长, 以长期保存饲草青绿多汁营养特性的简单而又经济的方法^[1]。在青贮饲料发酵过程中, 乳酸菌发挥着关键的作用^[2]。青贮饲料中乳酸菌种类较丰富, 然而, 乳酸菌并不是青贮饲料表面附着的唯一的微生物^[2], 梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酵母菌

(*Candida boidinii*)和霉菌(*moulds*)也常附着在青贮饲料表面, 并与乳酸菌竞争水溶性碳水化合物(*water soluble carbohydrate*, WSC)^[4]。另外, 不同地区、不同类型青贮饲料中乳酸菌种群结构和数量差异较大^[5]。当原料表面附着乳酸菌不足时, 人们往往采用添加乳酸菌制剂的方式进行青贮。青贮时添加乳酸菌制剂, 大多数能够有效改善青贮饲料的营养价值、发酵品质以及有氧稳定性^[6]。但也有研究^[10]发现, 受区域性环境因素的影响, 接种乳酸菌可能对青贮品质没有显著影响甚至会降低青贮品质, 因为其上附着的微生物可能更具竞争力, 从而主导青贮过程。因此在制作青贮饲料前, 应当先了解清楚青贮原料表面附着的微生物, 在此基础上选择适宜的乳酸菌制剂进行添加, 才能更有效地促进青贮饲料发酵品质和提升有氧稳定性。

有研究表明适应当地气候条件的乳酸菌菌株, 才能提升青贮饲料发酵品质, 而青贮原料表面附着的微生物会受气温、降水量、光照、平均相对湿度等气候因

收稿日期:2022-01-17; **修回日期:**2022-03-14

基金项目:云南省重大科技专项—绿色食品国际合作研究中心项目(2019ZG0909); 云南省万人计划青年拔尖人才专项项目

作者简介:李彦飞(1996-), 男, 云南富源人, 硕士研究生。

E-mail:3309707313@qq.com;

初晓辉(1979-), 男, 云南大理人, 硕士, 高级实验师, 主要从事饲草生产与草产品加工研究。

E-mail:641219875@qq.com

*通信作者。E-mail:shanguilian8203@126.com

子的影响^[11]。因此,开展不同地区青贮原料表面附着的乳酸菌群落结构特征的研究,筛选优势菌株,研发适应当地气候条件的乳酸菌制剂,对促进当地青贮产业及草地畜牧业的高效发展具有极大的推动作用。但目前,我国针对青贮饲料中乳酸菌种群分析和优质乳酸菌的筛选研究还相对比较薄弱。昆明地区前人开展过的青贮原料表面附着乳酸菌群落结构特征及优势菌株的研究较少。为研发出适应昆明气候条件的乳酸菌制剂,促进当地草地畜牧业的高效发展,本研究以自然发酵60 d的全株玉米(*Zea mays*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和鸭茅(*Dactylis glomerata*)3种青贮饲料为试验材料,开展昆明地区常见青贮饲料中天然乳酸菌群落结构特征分析及优良乳酸菌的筛选研究。通过筛选出适应昆明温暖湿润气候条件的优势乳酸菌菌株,为后续青贮用乳酸菌制剂的研发提供材料与理论支撑。

1 材料和方法

1.1 青贮原料及青贮样品的制作

青贮原料为曲辰9号青贮玉米(*Zea mays* cv. Quchen No. 9)、安巴鸭茅(*Dactylis glomerata* cv. Amba)和WL525紫花苜蓿(*Medicago sativa* WL525)。所有原料均采自云南农业大学校实习基地,取样时玉米处于蜡熟期,鸭茅处于抽穗期,紫花苜蓿处于现蕾期。

青贮样品的制作方法及流程如下:玉米和鸭茅采用常规青贮法进行青贮。2021年7月20日,将蜡熟期全株玉米、抽穗期鸭茅刈割,粉碎为3~4 cm小节、揉搓、充分混合均匀后装入5 L塑料桶、密封发酵,3次重复。紫花苜蓿采用半干青贮法进行青贮。2021年7月20日,将现蕾期紫花苜蓿刈割,晾晒至萎焉(含水量65.1%),粉碎为3~5 cm小节、充分混合均匀后装入5 L塑料桶、密封发酵,3次重复。

1.2 青贮样品取样及菌株分离

自然发酵60 d后开封,去掉塑料桶表层的青贮样品,将桶内剩余样品混拌均匀,称取青贮样品10 g,放入150 mL的广口锥形瓶中,加入90 mL的无菌水,用保鲜膜密封,放入150 r/min的恒温摇床上震荡2 h,混合均匀,即为0.1 g/mL的样品悬浊液,取1 mL悬液加到装有9 mL无菌水的试管中,用枪头吹打5次混匀,

即为0.01 g/mL的样品悬液,依次稀释至 0.1×10^{-6} g/mL。选取乳酸菌菌落数范围在30~300的3个稀释度,即 0.1×10^{-2} g/mL、 0.1×10^{-3} g/mL、 0.1×10^{-4} g/mL稀释度,利用稀释涂布平板法进行分离培养,取100 μ L,滴在加入预先灭菌的凝固MRS培养基表面,涂布均匀,放置在无菌操作台干燥30 min,将MRS培养基放于37 $^{\circ}$ C的恒温培养箱培养24~72 h,待菌落长成,用接种环从培养基中挑取典型菌落^[13]。为了确保真实地反映乳酸菌群落结构,从3种样品MRS培养基(购自上海博微生物科技有限公司)中各挑取30株菌株,依次编号为A1-A30(来自青贮玉米样品)、B1-B30(来自紫花苜蓿样品)、C1-C30(来自鸭茅样品),接种在平板培养基中,继代划线3次,得到纯化的菌株。

1.3 菌株形态学鉴定及保存

根据单株菌落的色泽、菌落特征、透明度、大小、形状、边缘等选取90株菌株进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验,初步判定有83株乳酸菌^[14]。将83株乳酸菌接种到MRS液体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养24~36 h。再将乳酸菌按1:1比例保存在40%的甘油中,-80 $^{\circ}$ C低温保存。

1.4 乳酸菌基因组的提取及16S rRNA基因序列鉴定

将纯化后的83株乳酸菌菌株用1 μ L接种环接种在装有新的MRS液体培养基的10 mL离心管中,放置在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24~36 h,所发酵形成的菌液用于DNA的提取。用2 mL离心管取乳酸菌培养液1.5 mL,10 000 r/min,离心1 min,将上清液倒掉,采用TIANamp细菌DNA试剂盒(DP302-02,天根科技有限公司,北京,中国)^[15],按照说明书提取DNA。DNA使用前-20 $^{\circ}$ C保存。

引物序列为27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492r:5'-AAGTCGTAACAAGGTAACC-3'^[16],由上海生工生物工程(云南)股份有限公司合成,PCR反应体系为50 μ L:2xSan Taq PCR Mix 25 μ L,引物27f(10 μ mol/L)和1492r(10 μ mol/L)各2 μ L,2 uL DNA作为模板,双蒸水19 μ L;PCR程序参数如下:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,98 $^{\circ}$ C变性50 s,55 $^{\circ}$ C退火50 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,共30个循环;扩增反应完成后,制作1.0%的琼脂糖凝胶,取5 μ L PCR产物,加样于

琼脂糖凝胶点样孔中进行电泳,电压为110 V,电流为130 mA,电泳液为0.5×TBE;电泳后,用紫外线凝胶成像仪进行观察,若观测到约为1 500 bp的条带,则PCR产物合格。将合格的PCR产物送样测序,测序工作由上海生工生物工程(云南)股份有限公司完成。利用BLAST分析方法,将测得的16S rDNA序列与GenBank的16SrRNA序列进行比对,相似度高于99%的序列被认为是同一株菌株^[16]。

1.5 乳酸菌的初选

从10 mL离心管中取发酵24~36 h的乳酸菌菌液,按照3%的接种量接种到新的MRS液体培养基中,放置在37℃的恒温培养箱中,在12 h和24 h时测 $D_{600\text{nm}}$ 及pH值,筛选出生长速率最高、产酸能力最强的9株菌株。根据Cai等^[16]描述的乳酸菌鉴定方法,对9株菌株进行革兰氏染色、菌落形态、过氧化氢酶活性和葡萄糖产气试验。

1.6 初选乳酸菌菌株系统发育树的构建

将初筛获得的9株菌株的16S rRNA序列与GenBank里的已知乳酸菌的序列进行同源性对比鉴定,找出与目的基因同源性最高的已知分类地位的3种菌株(表1)。利用软件MEGA version 7.0,采用邻近法构建系统发育树,进一步确定其分类^[17]。

表1 构建系统发育树参考菌株

Table 1 The reference strains for constructing phylogenetic tree

序号	菌种名称	菌株号	基因库序列注册号
1	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	HM162417
2	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM20336	AJ305321
3	短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC14869	M58810

1.7 优质乳酸菌的终选

将初选获得的9株菌株,按照3%的接种量接种到新的MRS液体培养基中,放置在37℃的恒温培养箱中,3 h测定1次 $D_{600\text{nm}}$ 及pH值。根据9株菌株的生长速率和产酸速率,最终筛选出生长速率快、产酸速率高的3株菌株为优质乳酸菌菌株。

1.8 优质乳酸菌产酸速率和生长曲线的测定

将最终筛选获得的3株菌株发酵液按照3%的接

种量接种到新的MRS液体培养基中,放置在37℃恒温培养箱中培养,3 h测定1次乳酸菌菌株发酵液的 $D_{600\text{nm}}$ 和pH值,连续测定24 h,绘制产酸速率曲线和生长速率曲线。

2 结果与分析

2.1 昆明地区自然发酵青贮饲料中乳酸菌群落特征

从昆明地区自然发酵的3种青贮饲料中收集到90株菌株,经检测,90株菌株中革兰氏染色呈阳性、过氧化氢呈阴性的有83株。通过16S rRNA序列和NCBI blastn序列比对,83株乳酸菌菌株分别属于乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、片球菌(*Pediococcus*)和魏斯氏菌(*Weissella*)3个属,包含了植物乳杆菌、戊糖片球菌、短乳杆菌和类肠膜魏斯氏菌(*W. paramesenteroides*)4个种,其中植物乳杆菌42株,占50.6%,戊糖片球菌和短乳杆菌各18株,占21.7%,类肠膜魏斯氏菌5株,占6.0%(表2)。

3种青贮饲料中乳酸菌种群结构为:全株玉米青贮饲料分离共获得27株菌株,分别为植物乳杆菌19株,短乳杆菌8株,各占青贮玉米中乳酸菌总数的70.4%和29.6%。从紫花苜蓿青贮饲料中分离获得26株菌株,分别为植物乳杆菌16株,短乳杆菌10株,各占青贮苜蓿中乳酸菌总数的61.5%和38.5%。从鸭茅青贮饲料中分离获得30株菌株,分别为植物乳杆菌7株,戊糖片球菌18株,类肠膜魏斯氏菌5株,各占青贮鸭茅中乳酸菌总数的23.3%、60.0%和16.7%(表2)。表明不同类型青贮饲料中天然乳酸菌种群结构存在一定的差异。在使用外源乳酸菌制剂制作青贮饲料前,需了解清楚青贮原料表面附着的优势乳酸菌种群,在此基础上合理选择外源乳酸菌制剂的类型,避免盲目添加。

2.2 乳酸菌生理生化特性及糖发酵特性

根据乳酸菌培养12 h和24 h时的 $D_{600\text{nm}}$ 值及pH值,从83株菌株中筛选出9株产酸能力强、生长速度快的菌株,分别是A9、A11、A19、B10、B16、B23、C10、C14和C23。生理生化特性测定结果表明,9株菌株均呈过氧化氢酶阴性和革兰氏阳性,其中A9、A11、A19、B10、B16、B23、C10均是杆状,初步判定为片球菌属;而C14、C23是球状,初步鉴定是乳杆菌属。9株菌株中,B10菌株能够利用葡萄糖产生气体,并产生乳酸,

表2 83株乳酸菌鉴定结果及分布详情

Table 2 Identification results and distribution details of 83 lactic acid bacteria strains

样品	菌株总数	序列对比结果 (>99%)	菌株数目
曲辰9号青贮玉米	27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	19
		<i>Lactobacillus brevis</i>	8
WL525紫花苜蓿	26	<i>Lactobacillus brevis</i>	10
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	16
安巴鸭茅	30	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	18
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	7
		<i>Weissella paramesenteroides</i>	5

表明B10菌株是异型乳酸菌,其余8株菌株不能利用葡萄糖产生气体,表明这8株菌株是同型乳酸

菌(表3)。

糖发酵试验结果表明,A9、A11、A19、B16、B23、C10菌株能够利用半乳糖、乳糖、七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨甘、山梨酸蔗糖、果糖、甘露糖和蜜二糖进行发酵,初步鉴定为植物乳杆菌。B10菌株能够利用半乳糖、阿拉伯糖、果糖和蜜二糖,不能利用其他糖进行发酵,且其形状为杆状,初步鉴定为短乳杆菌。C14、C23菌株形状为球状,能够利用半乳糖、七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、水杨甘、阿拉伯糖、果糖和甘露糖进行发酵,初步鉴定为戊糖片球菌(表4)。

2.3 乳酸菌系统进化树的构建

系统发育树构建结果显示,菌株A9、A11、A19、

表3 9株乳酸菌的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of 9 lactic acid bacteria strains

特征	乳酸菌								
	玉米			紫花苜蓿			鸭茅		
来源	A9	A11	A19	B10	B16	B23	C10	C14	C23
形状	杆状	球状	球状						
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	+	-	-	-	-	-
发酵类型	同型发酵	同型发酵	同型发酵	异型发酵	同型发酵	同型发酵	同型发酵	同型发酵	同型发酵

注:“+”代表90%以上菌株有活性或显阳性,“-”代表90%以上菌株无活性或显阴性

表4 9株乳酸菌糖发酵特性

Table 4 Sugar fermentation characteristics of 9 lactic acid bacteria strains

基质	A9	A11	A19	B10	B16	B23	C10	C14	C23
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	W	W	W	-	W	W	W	-	-
木糖	+	+	+	-	+	+	+	-	-
七叶苷	+	+	+	-	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	-	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	-	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	-	+	+	+	-	-
水杨甘	+	+	+	-	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	-	+	+	+	-	-
蔗糖	+	+	+	-	+	+	+	-	-
棉子糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
菊糖	-	-	-	-	-	-	-	W	W
马尿酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	+	-	-	-	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	-	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+	+	+	+	-	-

注:“+”表示生长,“-”表示不生长,“W”微弱生长。

B16、B23、C10 与 *Lactobacillus plantarum* 以 100% 相似度聚在同一支上,可鉴定为植物乳杆菌。菌株 B10 与 *Lactobacillus brevis* 以 100% 相似度聚在同一支上,

可鉴定为短乳杆菌。菌株 C14、C23 与 *Pediococcus pentosaceus* 以 100% 相似度聚在同一支上,可鉴定为戊糖片球菌(图 1)。

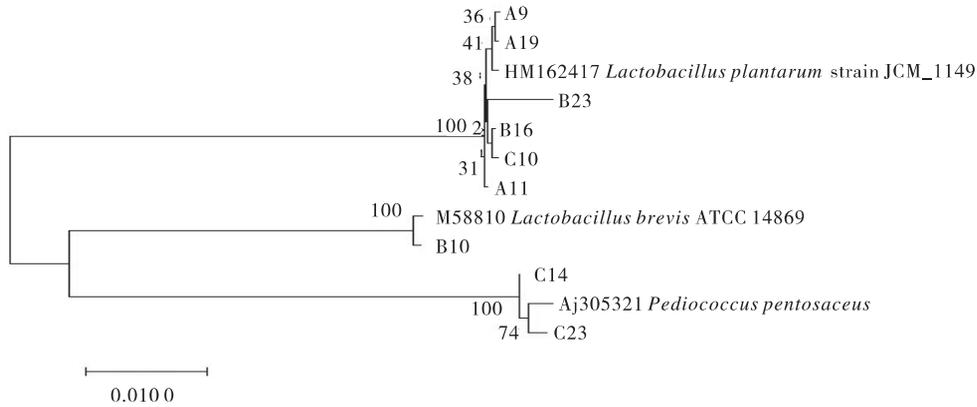


图 1 9 株乳酸菌菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 9 lactic acid bacteria strains

2.4 优质乳酸菌产酸速率及生长速度的测定

比较初筛获得的 9 株乳酸菌的生长速度及产酸速率,筛选出 B10、B16、C23 为产酸能力最强、生长速度最快的 3 株菌株,即 B10、B16、C23 为昆明地区 3 种青贮饲料中的优质菌株。3 菌株产酸速率测定结果表明(图 2),初始培养时,3 菌株的 pH 值均为 5.9。在培养的前 3 h,3 菌株 pH 值缓慢下降。培养 3~12h 期间,B16 的产酸速率最快,pH 值迅速下降,其次是 C23 菌株。培养 15 h 时,B16 菌株的 pH 值下降至 3.44,C23 菌株的 pH 值下降至 3.84。相比较而言,B10 菌株产酸能力相对较弱,pH 值下降相对较慢,培养 15 h 时其 pH 值仍高达 4.77。培养 18 h 时,B16 菌株和 C23 菌株的 pH 值基本达到稳定,此时 B16 菌株的 pH 值为 3.43,C23 菌株的 pH 值为 3.67,而 B10 菌株的 pH 值持续缓慢下降。就产酸速率来看,3 菌株产酸速率的快慢顺序为 B16>C23>B10。另外,乳酸菌在前期产酸能力较强,当 pH 值低于 4.0 以后,其产酸速率基本处于稳定阶段。

3 菌株生长曲线测定结果表明(图 3),在培养的前 3 h,3 菌株缓慢生长。培养 3~6 h 期间,B16 菌株快速生长, $D_{600\text{nm}}$ 值迅速增加,其次是 B10 菌株,此阶段 C23 菌株生长最慢。培养 6~12 h 期间,B16 菌株生长速度有所减缓,而 C23 菌株快速生长,至培养 12 h 时,C23 菌株和 B16 菌株的 $D_{600\text{nm}}$ 值基本相等,为 2.8 左右,之后 2 菌株的生长速度趋于平稳。与 C23 菌株和 B16 菌株相比较,B10 菌株在培养 6~12 h 时生长相对较慢,

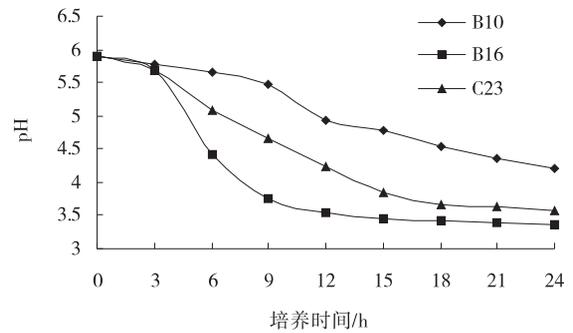


图 2 优质乳酸菌的产酸曲线

Fig. 2 Acid production curve of high-quality lactic acid bacteria strains

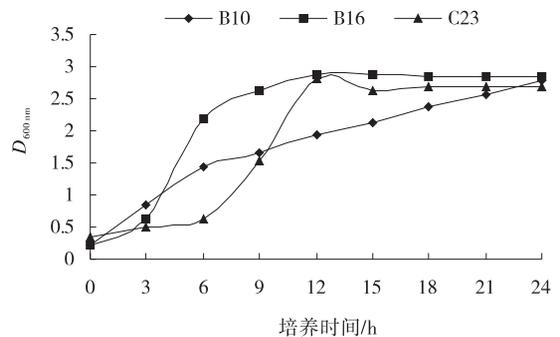


图 3 3 株乳酸菌生长曲线

Fig. 3 Growth curves of three strains of lactic acid bacteria
但在培养 12~24 h 间,生长速度快速增加,培养 24 h 时,其 $D_{600\text{nm}}$ 与 B16 和 C23 菌株基本相等。综合 3 菌株的生长速度可以看出,3 菌株生长速度的快慢顺序为 B16>C23>B10,与产酸速率测定结果一致。

3 讨论

植物附生微生物种群是动态变化的,因此气候特

征、温度、植物种类等^[5]外界环境均会影响青贮原料表面附着的微生物,从而对乳酸菌的鉴定和筛选造成影响。许冬梅^[12]在不同气候区及乳酸菌影响玉米青贮发酵的微生物组研究中发现,不同气候区全株玉米青贮发酵过程中的微生物动态变化差异较大。Zhang等^[18]以燕麦和小麦青贮饲料为试验材料,在极端高寒地区进行乳酸菌的分离鉴定,分离出植物乳杆菌 QZ227、蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*) QZ251、纤维二糖球菌(*Pediococcus cellicola*) QZ311、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) QZ1137 和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) QZ613 共 5 种菌株,但在湿热环境中,研究人员^[19]发现优质青贮原料中分离筛选出的主要乳酸菌为植物乳杆菌、鼠李氏菌(*L. rhamonsus*)、雷氏菌(*L. rapi*)、戊糖片球菌和洛氏菌(*P. lolii*)。为筛选出适宜昆明当地气候条件的乳酸菌制剂,本研究选取了昆明地区的全株玉米、紫花苜蓿、鸭茅 3 种青贮样品,通过分离鉴定出 83 株乳酸菌,所得乳酸菌主要是植物乳杆菌、戊糖片球菌和短乳杆菌,另外还有少数的类肠膜魏斯氏菌。其中,在‘曲辰 9 号’青贮玉米和‘WL525’紫花苜蓿青贮饲料中分离出的优势乳酸菌是植物乳杆菌和短乳杆菌,这一研究与袁浩等^[20]在青贮饲料中分离的乳酸菌种类相类似,研究指出在青贮饲料中主要的菌种是植物乳杆菌、短乳杆菌、戊糖片球菌。说明在昆明地区与贵州地区青贮玉米表面附着的优势乳酸菌优势菌群相似。但 Guan 等^[15]研究指出,在西南地区全株玉米青贮的主要优势菌群是明串珠菌科(*Leuconostocaceae*)、醋杆菌科(*Acetobacteraceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和莫拉菌科(*Moraxellaceae*)。这些差异的原因可能和地方气候条件和自然环境等因素有关。在‘WL525’紫花苜蓿青贮饲料中分离出的主要优势乳酸菌也是植物乳杆菌和短乳杆菌,但乳酸菌数量有差异,说明同一地区不同青贮饲料的乳酸菌群落结构是不同的。与之研究结果类似的是,毛婷等^[23]学者在苜蓿绿汁发酵液中分离鉴定、筛选出植物乳杆菌和戊糖片球菌等优势菌种。然而 Yang^[2]的研究结果显示,在苜蓿青贮中,肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)微生物是最丰富的附生菌群,其次是泛菌属(*Pantoea*)微生物和芽胞杆菌属(*Bacillus*)微生物。其原因可能是青贮原料表面附着的微

生物会受气温、降水量、光照、平均相对湿度等气候因子的影响。在‘安巴’鸭茅青贮饲料中分离出的主要优势菌是植物乳杆菌和戊糖片球菌,其次是类肠膜魏斯氏菌。综合分析前人研究和本研究,可以看出不同类型青贮饲料中乳酸菌种群结构差异较大,且不同地区同一类型青贮饲料中的乳酸菌种群结构也有差异,因此,在使用外源乳酸菌制剂制作青贮饲料前,需了解清楚青贮原料表面附着的优势乳酸菌种群,在此基础上合理选择外源乳酸菌制剂的类型,避免盲目添加。

生长速率和产酸速率是筛选优质乳酸菌的重要的指标^[24]。不同种类的乳酸菌其产酸能力和生长能力不一样^[25]。有研究表明,同型发酵乳酸菌在发酵初期便能快速产酸,且发酵效率更高,可作为青贮启动菌^[26]。郭琳娜等^[27]从紫花苜蓿中筛选出低可溶性糖环境下,具有较强产酸能力的同型乳酸发酵剂为戊糖片球菌,该菌对李斯特菌属(*Listeria*)、大肠杆菌和沙门氏菌属(*Salmonella*)均具有较强的抑菌率。本研究以 3 种青贮样品为原料,经过相关测定和筛选,最终筛选出优质乳酸菌菌株植物乳杆菌(B16)、戊糖片球菌(C23)以及短乳杆菌(B10),筛选出的 3 株菌株中,同型发酵乳酸菌 B16 和 C23 具有良好的产酸能力,异型发酵乳酸菌 B10 产酸能力略低,与前人研究结果相同^[2,4]。需要指出的是,虽然 B10 菌株产酸能力相对较弱,但该菌株为异型发酵乳酸菌,将异型发酵乳酸菌接种到青贮饲料中可以提高青贮饲料的有氧稳定性^[28]。因此,本研究筛选出的 3 株优质菌株,均可作为昆明本土乳酸菌添加剂研发的首选菌株。

4 结论

从昆明地区 3 种优质青贮饲料中共分离得到 83 株乳酸菌,生理生化特征和 16S rRNA 扩增测序表明天然植物乳杆菌是昆明地区青贮饲料中最常见的乳酸菌,占 50.6%;其次是戊糖片球菌和短乳杆菌,各占 21.7%。根据乳酸菌的生长活性和产酸能力,进一步筛选出优质乳酸菌 B10、B16 和 C23,它们分别为短乳杆菌、植物乳杆菌和戊糖片球菌,其产酸速率和生长速率的高低顺序为 B16>C23>B10。

参考文献:

- [1] 辛亚芬,陈晨,曾泰儒,等. 青贮添加剂对微生物多样性影响的研究进展[J]. 生物技术通报,2021,37(9):24-30.
- [2] 宗亚倩,鲁洪智,段新慧,等. 青贮玉米中乳酸菌的分离和鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2021,36(6):1071-1075.
- [3] Yang L, Yuan X, Li J, *et al.* Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 275: 280-287.
- [4] 关皓,曾泰儒,帅杨,等. 西南高温高湿地区青贮中天然乳酸菌群落结构特征及优质乳酸菌的筛选[J]. 草业科学, 2019,36(12):3203-3213.
- [5] 张志飞,王青兰. 牧草青贮乳酸菌研究进展[J]. 湖南生态科学学报. 2021,8(1):70-76.
- [6] 祁有鹏,左志,石斌刚,等. 粗饲料颗粒替代玉米青贮对肉牛瘤胃发酵及微生物菌群的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2021,56(2):50-60.
- [7] 高瑞红,徐嘉,张魏斌,等. 乳酸菌制剂对青贮玉米发酵品质和有氧稳定性的影响[J]. 中国饲料. 2018(8):70-74.
- [8] 翁玉楠,韦庆旭,张建鹏,等. 乳酸菌制剂对饲用油菜与全株玉米或玉米秸秆混合青贮品质的影响[J]. 动物营养学报,2021,33(5):2993-3000.
- [9] 王奇,余成群,李志华,等. 添加酶和乳酸菌制剂对西藏苇状羊茅和箭筈豌豆混合青贮发酵品质的影响[J]. 草业学报,2012,21(4):186-191.
- [10] 许冬梅,张萍,柯文灿,等. 青贮微生物及其对青贮饲料发酵品质影响的研究进展[J]. 草地学报,2017,25(3):460-465.
- [11] Xu D, Ding W, Ke W, *et al.* Modulation of metabolome and bacterial community in whole crop corn silage by inoculating homofermentative *Lactobacillus plantarum* and heterofermentative *Lactobacillus buchneri* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9:3299.
- [12] 许冬梅. 不同气候区及乳酸菌影响玉米青贮发酵的微生物组与代谢组学机制研究[D]. 兰州:兰州大学,2021.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [14] 顾娴,李晓敏,王国栋,等. 北方地区青贮玉米优良乳酸菌筛选以及初步应用[J]. 甘肃畜牧兽医. 2020,50(6):44-48.
- [15] Guan H, Yan Y, Li X, *et al.* Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265:282-290.
- [16] Cai Y, Benno Y, Ogawa M, *et al.* Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (8) : 2982-2987.
- [17] 李志忠,窦俊伟,任海伟,等. 玉米秸秆和白菜尾菜混贮料的乳酸菌多样性及耐高温优良菌株筛选[J]. 草业科学,2017,34(6):1337-1346.
- [18] Zhang M, Wang X, Cui M, *et al.* Ensilage of oats and wheatgrass under natural alpine climatic conditions by indigenous lactic acid bacteria species isolated from high-cold areas [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2):192368.
- [19] Nishizaki Y, Kimura H, Kitahara M, *et al.* Identification of thermo tolerant lactic acid bacteria isolated from silage prepared in the hot and humid climate of Southwestern Japan [J]. *Springerplus*, 2013, 2(1):1-12.
- [20] 袁洁,马冉冉,张文洁,等. 自然青贮多花黑麦草优良乳酸菌的筛选及对多花黑麦草青贮品质的影响[J]. 草业学报,2021,30(11):132-143.
- [21] 崔棹茗,郭刚,原现军,等. 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.
- [22] 付浩,金晶,朱欣,等. 贵州地区青贮饲料中天然乳酸菌分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 中国饲料,2021(15):17-23.
- [23] 毛婷,牛永艳,郑群,等. 菌剂对苜蓿青贮发酵品质及微生物群落的影响[J]. 生物技术通报,2021,37(9):86-94
- [24] 肖银全,王建福,刘立山,等. 不同乳酸菌制剂及装填时间对全株玉米青贮质量的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2019,54(2):40-46.
- [25] 李荣荣,郑猛虎,崔欣雨,等. 优良乳酸菌的筛选及对苜蓿青贮发酵品质的影响[J]. 中国草地学报,2021,43(11):69-75.
- [26] 张红梅,段珍,李霞,等. 青贮饲料乳酸菌添加剂的应用现状[J]. 草业科学,2017,34(12):2575-2583.
- [27] 郭琳娜,王雁萍,袁世超,等. 上海地区苜蓿附生乳酸菌中优良菌株的筛选和鉴定[J]. 饲料工业,2016,37(13):60-64.
- [28] 塔娜,魏日华,德庆哈拉,等. 对禾草源同型发酵和/或异型发酵乳酸菌发酵无芒雀麦青贮有氧稳定性的评价 [J]. 动物营养学报,2017,29(4):1301-1311.

Analysis of community structure and screening of excellent lactic acid bacteria in three silages

LI Yan-fei¹, CHU Xiao-hui¹, WANG Wen², YANG Shuang-shuang¹, MA Xiang-li^{1,3},
DUAN Xin-hui^{1,3}, SHAN Gui-lian^{1,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Sheep Breeding Promotion Center, Kunming 655204, China; 3. Yunnan Institute of

Plateau Characteristic Agricultural Industry, Kunming 650201, China)

Abstract: **【Objective】** In order to develop lactic acid bacteria preparation suitable for climate conditions in Kunming, and promote the efficient development of local grassland animal husbandry. **【Method】** Three silages, including whole plant corn, alfalfa and orchardgrass, were used as experimental materials to screen excellent lactic acid bacteria in this study, and 83 strains of natural lactic acid bacteria were obtained by subculture from them. **【Result】** The morphological characteristics and the construction of phylogenetic tree of 83 lactic acid bacteria strains showed as follows: *Lactobacillus plantarum* was the most common lactic acid bacteria in Silages in Kunming, accounting for 50.6%, followed by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis*, accounting for 21.7% respectively. Three high quality lactic acid bacteria (B10, B16, C23) were selected from 83 strains according to their growth activity and acid production ability. **【Conclusion】** Physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequencing analysis showed that B10, B16 and C23 were *L. brevis*, *L. plantarum* and *P. pentosaceus*, respectively. The acid production rate and growth rate from high to low was B16>C23>B10.

Key words: silage; lactic acid bacteria; morphological characteristics; phylogenetic tree