

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2019-0006

马召稳, 李元晓, 梁含, 王占彬, 李旺. 苜蓿青贮中微生物种群分析及主要菌种的筛选鉴定. 草业科学, 2019, 36(11): 2980-2988.

MA Z W, LI Y X, LIANG H, WANG Z B, LI W. Analysis of microbial populations in alfalfa silage and screening and identification of the main strains. Pratacultural Science, 2019, 36(11): 2980-2988.

苜蓿青贮中微生物种群分析及主要菌种的筛选鉴定

马召稳, 李元晓, 梁含, 王占彬, 李旺

(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 苜蓿 (*Medicago sativa*) 作为反刍动物最主要的粗饲料蛋白来源, 可通过青贮保持其最佳的饲用价值。本研究旨在分析苜蓿青贮的主要微生物组成, 并在此基础上筛选到苜蓿青贮的主要菌种, 研发适合苜蓿青贮的微生物添加剂。首先利用宏基因组测序技术对天然半干苜蓿青贮中的微生物种群数量和群落组成进行分析, 然后根据分析结果利用 MRS、NA、LB、PDA 以及麦氏培养基, 采用有氧和厌氧两种培养方式从天然苜蓿青贮饲料中筛选微生物菌种; 对筛选到的微生物菌种进行形态学和分子生物学的鉴定确定其种属。结果表明, 苜蓿青贮中的主要微生物群落(鉴定到属的水平)为海洋杆菌属 (*Oceanobacillus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 分别占到 24.9%、14.3%、13.9%。在 37 °C 有氧和厌氧条件下以不同培养基共分离出 30 株菌株。经过形态学和保守序列比对确定, 其中 15 株为植物乳杆菌 (*L. plantarum*), 8 株为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*); 2 株地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*); 乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、阿氏芽孢杆菌 (*B. aryabhatai*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 各 1 株。所筛选菌株和鉴定结果与宏基因组测序的分析结果相一致, 表明所筛选的菌种可靠性。

关键词: 苜蓿青贮; 宏基因组; 微生物; 筛选鉴定;

中图分类号: S816.5⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0629(2019)11-2980-09

Analysis of microbial populations in alfalfa silage and screening and identification of the main strains

MA Zhaowen, LI Yuanxiao, LIANG Han, WANG Zhanbin, LI Wang

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China)

Abstract: Alfalfa is the most important source of roughage protein for ruminants. It has its optimal feed value when used as silage. The purpose of this study was to analyze the main microbial composition of alfalfa silage, to screen the main strains of alfalfa silage on this basis, and to develop microbial additives suitable for alfalfa silage. Firstly, the microbial population and community composition in natural semi-dry alfalfa silage were analyzed by macrogenomic sequencing. Based on this analysis, MRS, NA, LB, PDA and Mai's media were used to screen microbial species from natural alfalfa silage fodder, under both aerobic and anaerobic culture conditions. The species and genera of the screened microorganisms were identified by morphological and molecular biological methods. The results showed that the main microbial communities (identified at

收稿日期: 2019-01-05 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 河南省重大科技专项“功能性生物蛋白关键技术研发与产业化”(131100110300)

第一作者: 马召稳 (1989-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士生, 研究方向为草业科学。E-mail: mazhaowen721@163.com

通信作者: 李旺 (1976-), 男, 河北丰宁人, 副教授, 博士, 研究方向为饲料资源开发和饲料生物技术。E-mail: liwang@haust.edu.cn

the genus level) in alfalfa silage were *Oceanobacillus*, *Lactobacillus*, and *Bacillus*, which accounted for 24.9%, 14.3%, and 13.9% of the detected microorganisms, respectively. A total of 30 strains were isolated on different media, under aerobic and anaerobic conditions, at 37 °C. After morphological analysis and conservative sequence alignment, 15 strains were identified as *L. plantarum*; 8 strains were identified as *B. subtilis*; 2 strains were identified as *B. licheniformis*; and 1 each was identified as *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *B. aryabhattai*, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens*. The selected strains and their identification results were consistent with the results of macrogenomic sequencing analysis, indicating the reliability of these results.

Keywords: alfalfa silage; metagenome; microorganism; screening; identification

Corresponding author: LI Wang E-mail: liwang@haust.edu.cn

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是世界上栽培面积最大的豆科牧草, 再生能力强, 抗逆性好, 生长速度快, 营养丰富, 有“饲草之王”的美称^[1]。当前我国苜蓿产品主要以调制青干草为主, 但调制干草的过程中因雨淋、落叶等因素使营养成分损失较大^[2-3]。青贮是保存青饲料营养物质的有效方法。该方法是一个复杂的微生物区系变化过程, 涉及到乳酸菌、腐败菌、酵母菌、霉菌、芽孢杆菌等多种微生物^[4], 这些微生物存在于青贮原料、青贮发酵过程中和发酵完成后等所有时期, 并与青贮原料种类和青贮时期有很大关系^[5-6]。其中乳酸菌是青贮发酵成功的关键微生物^[7]。

微生物青贮添加剂可有效缩短青贮饲料制作时间, 提升青贮饲料制作的成功率, 提高青贮饲料品质。目前主要使用的微生物菌种有乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 及部分芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等。研究发现, 利用枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 组合对玉米 (*Zea mays*) 进行青贮, 制作的青贮饲料品质优良^[8]。添加凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、植物乳杆菌、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 和乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 的全株玉米青贮在感官评价上均优于未添加微生物的自然发酵组^[9]。

苜蓿青贮的制作要通过晾晒使水分降至 65% 左右制成半干青贮或者依靠青贮添加剂^[10-13]。苜蓿青贮常用的微生物添加剂为乳酸菌, 乳酸菌能够利用发酵糖分产生乳酸, 快速降低其 pH, 有效抑制霉菌等有害微生物的活动, 从而降低青贮饲料养分损失提高青贮饲料发酵品质^[2, 14]。王丽学等^[15]利用 5 种乳酸菌对紫花苜蓿进行青贮发现, 植物乳

杆菌和乳酸片球菌能够显著提高青贮品质。然而, 有研究表明仅添加乳酸菌, 能够降低有氧稳定性^[16], 通过添加乳杆菌、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 及不可培养酸杆菌对苜蓿进行裹包青贮, 发现 3 种菌剂能够显著提高苜蓿青贮品质和有氧稳定性^[17]。由于青贮原料的差异, 导致苜蓿青贮过程微生物种群变化情况存在很多未知。

随着研究的深入, 很多报道从基因水平研究青贮饲料微生物种群组成。徐振上^[18]使用 16S rDNA 宏基因组技术对玉米青贮过程中细菌群落变化进行分析, 结果显示厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 三者占据了菌群的 95% 以上。本研究旨在通过分子生物学技术对苜蓿青贮的微生物菌群进行分析, 筛选适合苜蓿青贮的微生物菌种, 并对其进行鉴定, 开发苜蓿青贮微生物添加剂, 改善苜蓿青贮的品质。

1 材料与方法

1.1 材料

苜蓿品种为阿尔冈金 (Algonquin), 河南科技大学实验牧场种植第 3 年, 春季第 1 茬, 初花期刈割后在试验田晾晒 24 h, 用于苜蓿青贮制作。

培养基^[19]有: MRS 培养基 [葡萄糖 4 g, 胰蛋白胍 2 g, 酵母提取物 1 g, 牛肉膏 2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.007 6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, Tween-80 0.2 mL, K_2HPO_4 0.4 g, 柠檬酸胺 0.4 g (固体培养基加琼脂粉 3.2 g), 无菌水 200 mL, pH 6.2~6.4]; LB 培养基 [胰蛋白胍 2 g, 酵母提取物 1 g, 氯化钠 2 g (固体培养基加琼脂粉 3.2 g), 无菌水 200 mL, pH 7.0~7.2]; NA 培养基 [牛肉膏 0.6 g, 蛋白胍 2 g,

氯化钠 1 g, 无菌水 200 mL (固体培养基加琼脂粉 3.2 g), pH 7.2]; PDA 培养基 [去皮马铃薯 40 g, 加入 200 mL 无菌水煮沸 20 min, 双层纱布过滤后补充水至 200 mL, 加入葡萄糖 4 g (固体培养基加琼脂粉 3.2 g), 121 °C 高压灭菌 20 min, 用乙醇溶解 0.02 g 氯霉素, 加入培养基中]; 麦氏培养基 [葡萄糖 0.2 g, 氯化钾 0.36 g, 酵母粉 0.5 g, 乙酸钠 1.64 g (固体培养基加琼脂粉 3.2 g), 蒸馏水 200 mL]。

主要试剂: 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 生化试剂购自 TAKARA 生物公司, 其他化学试剂均为分析纯, 购自洛阳博冠商贸有限公司。

采用通用引物^[20], 上游: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAC-3', 下游: 5'-AAGGAGGTGATCCAG CC-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 苜蓿青贮的制作

将刈割的紫花苜蓿晾晒至水分含量为 65% 左右时, 用剪刀剪成 1 cm 长的小段, 装入 500 mL 广口瓶中, 压实密封, 厌氧发酵, 制作 3 瓶, 每瓶为 1 个重复。

1.2.2 苜蓿青贮品质评定^[21]

青贮第 60 天取样, 3 个重复取样后混合均匀, 由具有青贮饲料质量评估经验的 3 人做现场感官评分, 评定标准参考《德国 DLG 青贮饲料感官评分标准》^[22] 分为优 (20~16 分)、良 (15~10 分)、中 (9~5 分) 和下 (4~0 分) 4 个等级。评分内容为嗅觉、结构和色泽: 嗅觉分 5 个等级 (0~14 分); 结构分 4 个等级 (0~4 分); 色泽分 3 个等级 (0~2 分)。

1.2.3 苜蓿青贮样品宏基因组测序分析

由美因健康科技(北京)有限公司协助完成。

细菌基因组 DNA 的提取与质量检测: 将苜蓿青贮 3 个重复各取 3 g 样品混合均匀, 按照细菌基因组提取试剂盒说明进行苜蓿青贮中细菌全基因组 DNA 的提取, 利用 Nanodrop 检测 DNA 的纯度和浓度, 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 然后利用 Qubit3.0 对 DNA 浓度进行精确定量。

宏基因组文库的构建及质量检测: 使用 Covaris 超声波破碎仪进行随机打断, 选取合适长度的片

段, 经过末端修复、3'端加 A、加接头、纯化、扩增等完成宏基因组文库制备, 文库的质量检测为: 用 Qubit3.0 对文库初步定量并稀释至 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ → Qsep100 对文库的 Insert Size 检测 → 利用 Q-PCR 对文库有效浓度进行准确定量。宏基因组文库质检合格后按照有效浓度和目标下机数据量进行上机测序, 测序策略为 Illumina Hiseq, PE150。

测序完成后, 对原始下机数据进行质量控制 (Raw Data)、拼接组装、基因预测并构建非冗余基因集 (gene catalogue), 然后对得到的基因进行物种和功能上的注释、分类以及丰度统计, 在上述分析的基础之上, 对样品或样品组间进行相似聚类, 分组排序, 差异比较等多方向的统计分析, 并对结果进行可视化展示。

1.2.4 微生物菌种的筛选

微生物的筛选方法参考文献 [7] 的操作方法作进一步优化调整。在超净台中将 10 g 青贮样品剪碎后放入 90 mL 无菌水混合于 150 mL 三角瓶中, 封口膜封口, 置于摇床上震荡 30 min, 配置 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 共 3 种稀释梯度, 取 50 μL 稀释液滴在 MRS、NA、LB、PDA 以及麦氏培养基上, 用涂布棒将菌液在培养基上涂抹均匀, 然后将培养基倒转静置 20~30 min, 将 MRS 和麦氏培养基在 37 °C 厌氧、NA、LB、PDA 在 37 °C 有氧条件下培养 24~48 h, 分离微生物。

1.2.5 微生物菌株的鉴定

形态学鉴定: 对所筛菌种进行纯培养, 分别在不同的固体培养基上, 观察菌落的形态、颜色、大小、光泽等菌落特征, 用接种环分别挑取单菌落, 进行革兰氏染色^[23], 显微镜下观察菌体颜色、大小、形状、是否有芽孢等菌体特征。

分子生物学鉴定: 参照细菌基因组提取试剂盒说明书, 提取所筛菌种基因组 DNA, 扩增菌种的 16S rDNA 保守序列。对扩增产物进行测序, 并通过 NCBI BlastN 进行保守序列的分析比对。PCR 扩增体系为 25 μL 体系, 包括: ① $10 \times \text{Ex Taq buffer}$: 2.5 μL , ② dNTP: 2 μL , ③ 上游引物: 1 μL , ④ 下游引物: 1 μL , ⑤ Ex Taq 酶: 0.5 μL , ⑥ 模板 (基因组 DNA): 1 μL , ⑦ ddH₂O: 17 μL 。PCR 反应条件及程序为: 预变性 94 °C 2 min → 35 个循环 (变性 94 °C 30 s → 复性 57 °C 30 s → 延伸 72 °C 1 min 30 s) → 终延伸 72 °C 10 min → 4 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 苜蓿青贮质量评定

对所制作的苜蓿青贮样品进行品质评定，气味评分 10.78，结构评分 3.22，色泽评分 1.56，综合评分 15.56，结果显示，青贮品质评定等级为良好。

2.2 苜蓿青贮中微生物种群分析

2.2.1 宏基因组文库基因信息分析

通过构建宏基因组文库，从苜蓿青贮样品中筛选和组装了 60 710 个基因样品，通过测序得知这些基因总长度为 39 948 615 bp，平均长度为 720.04 bp，对其进行了编号并计算了基因丰度信息。将这些

基因在 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库与 Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) 数据库中进行 BLAST(balst p) 比对分析和功能注释；经过分析苜蓿青贮宏基因组中的基因主要涵盖 6 大功能类：糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶 (glycosyl transferases, GTs)、多糖裂合酶 (polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterases, CEs)、辅助氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 和碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBMs)。

2.2.2 宏基因组文库物种信息分析

利用宏基因组测序技术扩增苜蓿青贮中微生物保守序列，并对基因丰度在 0.1% 以上的基因序列进行相似性分析和比对 (图 1)。可以看出，相似性

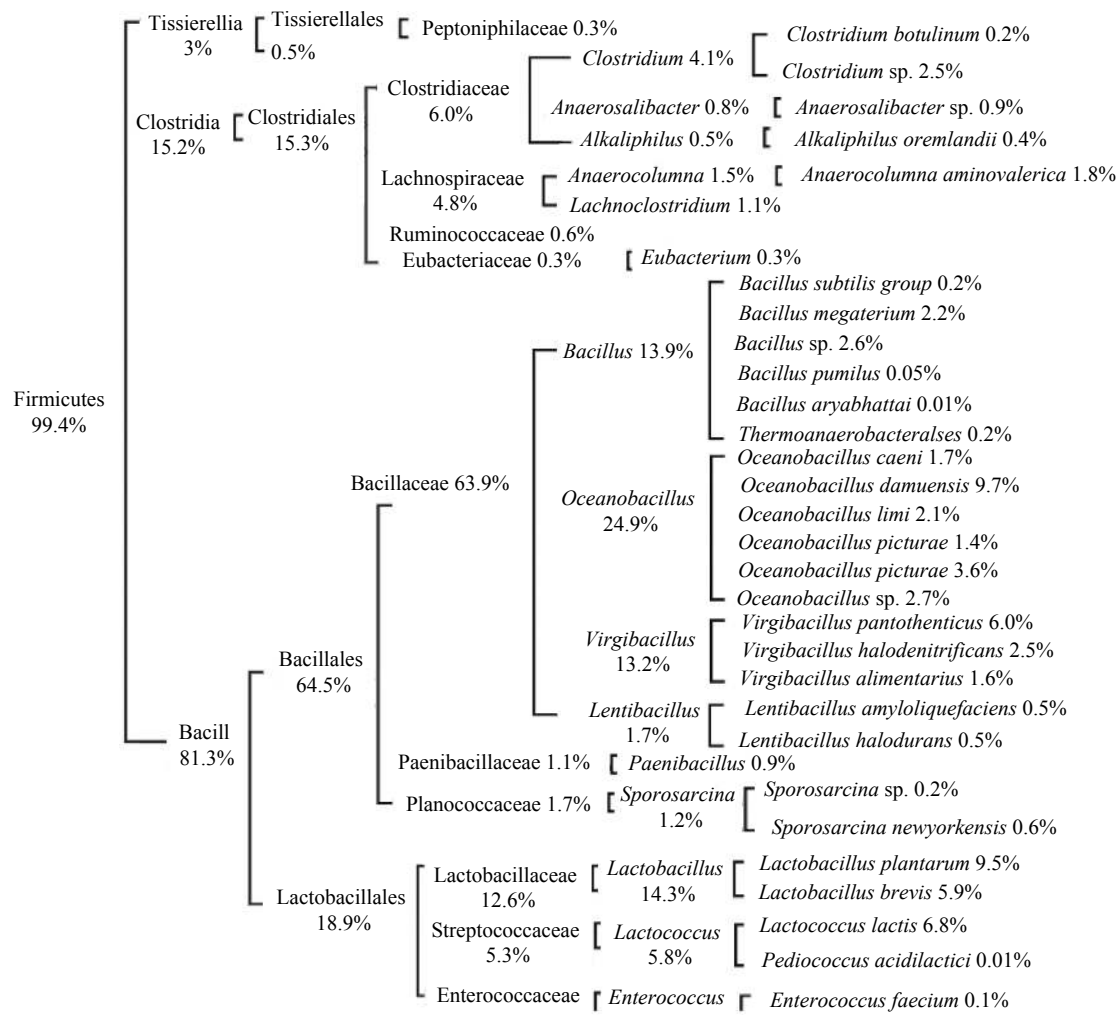


图 1 苜蓿青贮中微生物菌种群落分析

Figure 1 Analysis of microbial communities in alfalfa silage

图中百分数表示在门、纲、目、科、属和种分类水平上基因丰度 > 0.1% 的物种比例。
The percentages means the proportion of species with gene abundance > 0.1% at the level of phylum, class, order, family, genus and species classification.

大于 95% 水平上的微生物物种共有 53 587 个, 分属 18 个门, 28 个纲, 59 个目, 87 个科, 207 个属, 672 个微生物物种。厚壁菌门物种基因丰度可达 99.4%, 为主要优势微生物群落。序列测定基于目水平的分析, 微生物群落数为 51 822 个, 主要以芽孢杆菌目 (*Bacillales*) 和乳酸菌目 (*Lactobacillales*) 为主, 分别占到目水平微生物群落总数的 64.5% 和 18.9%。基于属的水平可分析, 微生物群落总数为 43 502 个, 其主要微生物群落为海洋杆菌属 (*oceanobacillus*)、乳杆菌属 (*Lactobacilli*)、芽孢杆菌属 (*Bacilli*)、枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*)、乳酸球菌属 (*Lactococcus*) 以及部分梭菌属 (*clostridium*) 等。其所占比例分别达到了 24.9%、14.3%、13.9%、13.2%、5.8%、4.1%。

在种的水平对苜蓿青贮微生物菌种分析, 结果显示芽孢杆菌菌种所占的比例较大, 主要有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、阿氏芽孢杆菌 (*Bacillus aryabhattai*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 以及尚未鉴定到种的部分芽孢杆菌属菌株 (*Bacillus* sp.)。海洋杆菌属的微生物菌种主要为 *O. damuensis* 及未鉴定到种的部分 *Oceanobacillus* sp. 菌株。乳杆菌属微生物菌种主要有植物乳杆菌及短乳杆菌 (*L. brevis*) 等。乳酸球菌属的微生物菌种主要为乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 和乳酸片球菌。肠球菌属的菌株主要是粪肠球菌 (*E. faecalis*) 和屎肠球菌 (*E. faecium*)。枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*) 的菌种主要为 *V. pantothenicus*、*V. halodenitrificans* 以及 *V. alimentarius* 等。

2.3 苜蓿青贮主要微生物菌种的筛选

利用 MRS 培养基厌氧培养的方式从苜蓿青贮中共筛选出 13 株菌株, 暂命名为 MRS1、MRS2、MRS3、MRS4、MRS5、MRS6、MRS7、MRS8、MRS9、MRS10、MRS11、MRS12、MRS13; 利用麦氏培养基厌氧培养方式筛选出 3 株菌株, 暂命名为 MC1、MC2、MC3; PDA 培养基好氧培养筛选出 8 株菌株, 暂命名为 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8; 利用 NA 培养基和 LB 培养基好氧培养分别从苜蓿青贮中筛选出 2 株和 4 株菌株, 暂命名为 NA1、NA3 和 LB2、LB5、LB6、LB7。

2.4 菌株的形态学鉴定

2.4.1 菌株的菌落特征鉴定结果

从苜蓿青贮中分离出的菌株 MRS1~13、MC1~3 及 NA1 的菌落特征为圆形、边缘整齐、表面光滑、中央凸起的乳白色单菌落 (图 2A)。菌株 P5、P8、LB2、LB5、LB6 菌落表面不光滑, 边缘不整齐, 中部有突起的皱褶 (图 2B)。菌株 P1~P4、P6、P7、LB7 和 NA3 的菌落呈白色, 边缘不整齐, 表面不光滑, 有突起的皱褶 (图 2C)。

2.4.2 菌株的菌体特征鉴定结果

从苜蓿青贮中分离出的菌株 MRS1~9、MRS11、MRS12、MRS13、以及 MC1、MC2、MC3 革兰氏染色结果为革兰氏阳性, 短杆状, 单个或呈链状排列 (图 3A)。MRS10 和 NA1 革兰氏染色呈球形, 单个或链状排列的革兰氏阳性菌 (图 3B)。菌株 PDA1~8、LB7 和 NA3 革兰氏染色结果为革兰氏

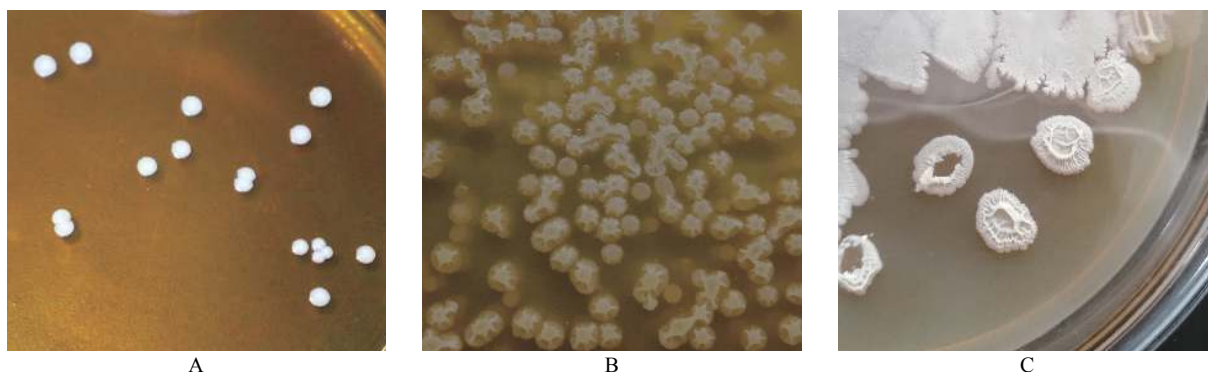


图 2 苜蓿青贮中的部分菌株菌落特征

Figure 2 Bacterial colonies in alfalfa silage

A、B、C 分别表示菌株 MRS1、LB2、PDA1 的菌落特征。

A, B, and C are the colony characteristic of strain MRS1, LB2, and PDA1, respectively.

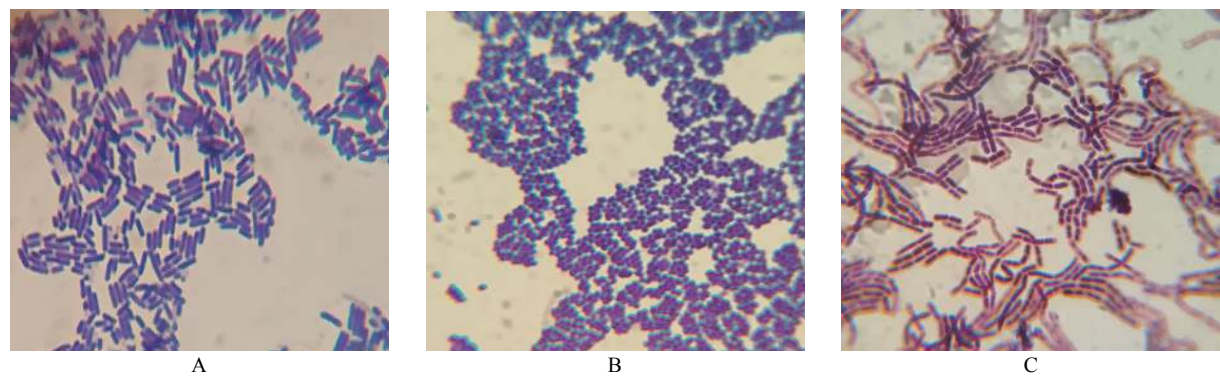


图 3 苜蓿青贮中筛选出的部分菌株菌体
Figure 3 Strains isolated from alfalfa silage

A 为菌株 MRS1 革兰氏染色，B 为菌株 NA1 的革兰氏染色，C 为菌株 PDA1 的革兰氏染色。
A is the gram stain of MRS1, B is the gram stain of NA1, C is the gram stain of PDA1.

阳性、杆状、单个或短链状排列，芽孢中生或端生(图 3C)。

2.5 分子生物学鉴定

提取筛选到的微生物的基因组 DNA，以每个菌种基因组 DNA 为模板，以细菌 16S rDNA 序列通用引物对其保守序列进行扩增(图 4)。可以看出，所筛菌种均成功扩增出大小约 1 500 bp 左右的

DNA 片段。对扩增片段进行序列测定，将序列测定结果经 NCBI Blast N 进行序列比对发现菌株 MRS1~MRS9 和 MRS11~MRS13 以及 MC1~MC3 与植物乳杆菌 (MG551233.1) 的相似度达到了 99.8%；菌株 MRS10 与乳酸片球菌菌株 (KY550661.1) 的相似度达到 98.42%；菌株 NA1 与粪肠球菌 (CP028727.1) 的相似度达到了 98.80%；菌株 LB6 与阿氏芽孢杆菌 (KU052707.1) 的相似度达到了 99.44%；菌株

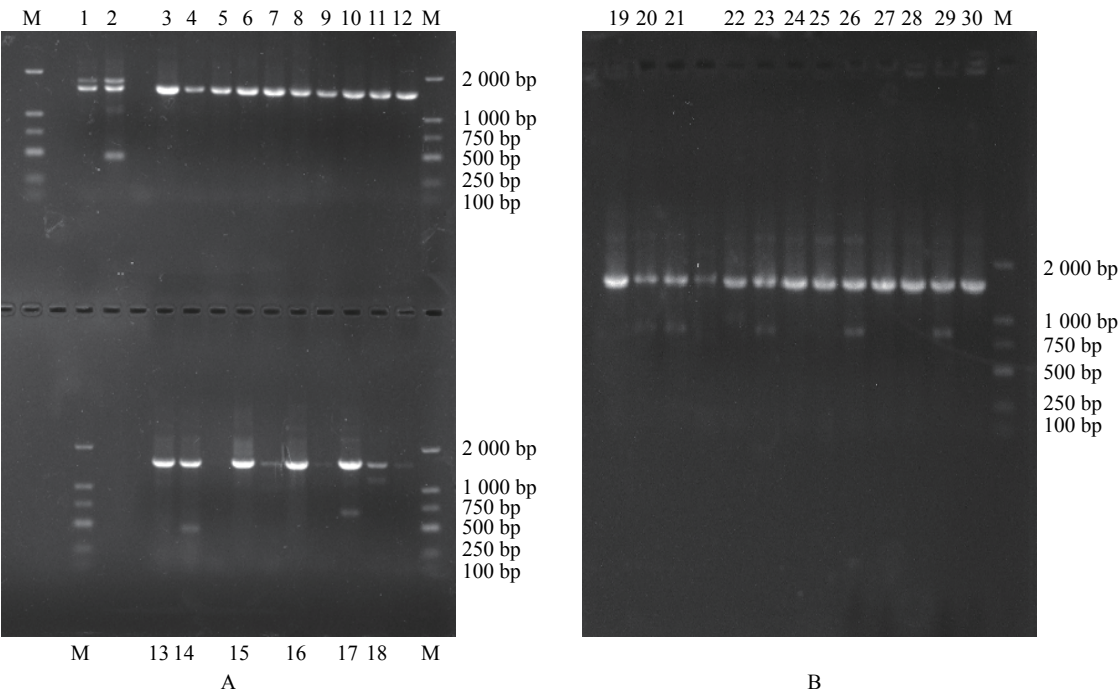


图 4 试验所筛 30 株菌株的 16S rRNA gene 电泳图

Figure 4 16S rRNA gene amplification products of the 30 strains screened in this experiment

M, DL2000; 1– 3: MC1, MC2, MC3; 4 – 12: MRS1, MRS2, MRS3, MRS4, MRS5, MRS6, MRS7, MRS8, MRS9; 13 – 16: MRS10, MRS11, MRS12,MRS13; 17 – 19: NA1, NA3, LB2; 20 – 22: LB5, LB6, LB7; 23 – 30: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8.

P1~P4、P6、P7、LB7、NA3 与枯草芽孢杆菌菌株(KC422328.1)相似度达到 99.58%; 菌株 LB5、P5 与地衣芽孢杆菌菌株(CP035404.1)的相似度达到了 99.92%; 菌株 P8 与短小芽孢杆菌菌株(KC692158.1)的相似度达到了 99.55%。菌株 LB2 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)菌株(CP029071.1)的相似度达到了 99.63%。结合形态学鉴定, 初步确定从苜蓿青贮样品中筛选到植物乳杆菌 15 株, 乳酸片球菌和粪肠球菌各 1 株, 各种芽孢杆菌 12 株。说明苜蓿青贮样品中的微生物菌种以乳酸菌和芽孢杆菌为主。

3 讨论与结论

本研究采用宏基因组测序技术对苜蓿青贮中微生物菌落进行分析, 结果显示, 厚壁菌门微生物的基因丰度高达 99.4%, 其中海洋杆菌属、乳酸杆菌属以及芽孢杆菌属等基因丰度较大, 与徐振上^[18]在青贮玉米中微生物菌群分布的研究结果相似。但本研究在属的水平分析的微生物物种与已有报道差异较大, 可能的原因是青贮原料差别所引起, 也可能与样品开封后在氧气中暴露的程度有关^[6, 24]。

在青贮饲料菌种筛选上, 有报道从青贮玉米及苜蓿青贮中筛选出不同的微生物菌种。李旭娇和玉柱^[25]利用传统微生物培养方法从苜蓿青贮饲料

中筛选到 4 株植物乳杆菌。韩吉雨^[26]通过对青贮发酵体系中乳酸菌多样性的研究发现, 玉米青贮饲料在发酵第 60 天时筛选出的微生物有植物乳杆菌。张慧杰等^[27]从阿尔冈金和敖汉两个品种的紫花苜蓿青贮饲料中筛选到了乳酸片球菌。韩吉雨^[26]筛选出的与乳酸片球菌特征一致的菌种, 说明乳酸片球菌是苜蓿青贮的另一个主要菌种。除了乳酸菌之外, 张涛^[28]、席琳乔等^[29]分别在苜蓿青贮和青贮玉米中筛选到地衣芽孢杆菌的近缘菌种。芽孢杆菌能够产生具有抑制酵母和霉菌的细菌素, 能够显著提高青贮饲料的有氧稳定性^[30], 并参与青贮饲料的整个发酵过程。

本研究筛选到植物乳杆菌 15 株, 乳酸片球菌和粪肠球菌各 1 株, 各种芽孢杆菌 12 株。与已有报道结果基本一致, 说明乳酸菌和芽孢杆菌是青贮饲料的主要微生物菌种^[25, 28]。传统微生物筛选方法不能完全获得青贮饲料微生物种群的信息。本研究通过宏基因组测序分析了苜蓿青贮中的主要微生物类群, 并通过配制相应的培养基筛选到主要的微生物菌种, 对微生物种属的鉴定结果与宏基因组测序分析结果相一致。说明宏基因组测序技术能够有效分析苜蓿青贮样品中的微生物组成和种群信息, 为筛选和使用苜蓿青贮中的微生物提供很大帮助。

参考文献 References:

- [1] 杨茁萌, 李胜利. 中国苜蓿产业发展面临的问题及其对策. 中国畜牧杂志, 2008, 44(20): 41-45.
YANG Z M, LI S L. Problems and countermeasures of alfalfa industry status in China. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(20): 41-45.
- [2] 李向林, 万里强. 苜蓿青贮技术研究进展. 草业学报, 2005, 14(2): 9-15.
LI X L, WAN L Q. Research progress on *Medicago sativa* silage technology. Acta Prataculturae Sinica, 2005, 14(2): 9-15.
- [3] 云颖, 赵苗苗, 双胡尔, 吴哲, 玉柱. 刈割期和添加剂对苜蓿青贮发酵品质和 CNCPS 蛋白组分的影响. 草业科学, 2005, 14(2): 9-15.
YUN Y, ZHAO M M, SHUANG H E, WU Z, YU Z. Effect of mowing period and additives on fermentation quality and CNCPS protein components of alfalfa silage. Pratacultural Science, 2005, 14(2): 9-15.
- [4] 许冬梅, 张萍, 柯文灿, 郭旭生. 青贮微生物及其对青贮饲料发酵品质影响的研究进展. 草地学报, 2017, 25(3): 460-465.
XU D M, ZHANG P, KE W C, GUO X S. Research process in silage microorganism and its effects on silage quality. Acta Agrectir Sinica, 2017, 25(3): 460-465.
- [5] 胡宗福, 常杰, 萨仁呼, 王思珍, 牛化欣. 基于宏基因组学技术检测全株玉米青贮期间和暴露空气后的微生物多样性. 动物营养学报, 2017(10): 329-339.
HU Z F, CHANG J, SA R H, WANG S Z, NIU H X. Microbial diversity of whole-plant maize during ensilage and after air

- exposure analyzed by metagenomics technology. *Chinese Journal Of Animal Nutrition*, 2017(10): 329-339.
- [6] 张慧杰. 饲草青贮微生物菌群动态变化与乳酸菌的鉴定筛选. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011.
ZHANG H J. Dynamic changes of microflora and identification and screening of lactic acid bacteria in forage silage. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011.
- [7] 李宝明, 杨织瑞. 乳酸菌添加剂对青贮饲料中微生物菌群的影响. *畜牧兽医杂志*, 2016, 35(1): 13-17.
LI B M. YANG Z R. Effect of lactic acid bacteria additive on the microbial groups in silage. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016, 35(1): 13-17.
- [8] 王凤林, 张莉娟, 孟媛, 袁昕昕, 袁军涛, 李书巧, 温荣辉. 不同比例微生物组合对玉米秸秆青贮品质的影响. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(11): 4701-4706.
WANG F L, ZHANG L J, MENG Y, YUAN X X, YUAN J T, LI S Q, WEN R H. Effects of different proportions of microbial combinations on the quality of corn straw silage. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(11): 4701-4706.
- [9] 王丽学, 范寰, 霍文娟, 刘景喜, 潘振亮, 陈龙宾, 韩静, 冯婧, 孟繁瑞. 4 种复合微生物菌剂对全株玉米青贮的影响研究. *中国饲料*, 2016(12): 22-26.
WANG L X, FAN H, HUO W J, LIU J X, PAN Z L, CHEN L B, HAN J, FENG J, MENG F R. Effects of four kinds of compound microbial agents on whole plant corn silage. *China Feed*, 2016(12): 22-26.
- [10] 刘贤, 韩鲁佳, 原慎一郎, 野中和久. 不同添加剂对苜蓿青贮饲料品质的影响. *中国农业大学学报*, 2004, 9(3): 25-30.
LIU X, HAN L J, Yuanshenyilang, Yezhonghejiu. Effects of different additives on the quality of alfalfa silage. *Journal of China Agricultural University*, 2004, 9(3): 25-30.
- [11] 刘辉, 卜登攀, 吕中旺, 李发弟, 刘士杰, 张开展, 王加启. 凋萎和不同添加剂对紫花苜蓿青贮品质的影响. *草业学报*, 2015, 24(5): 126-133.
LIU H, PIAO D P, LYU Z W, LI F D, LIU S J, ZHANG K Z, WANG J Q. Effects of wilting and additives on fermentation quality of alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(5): 126-133.
- [12] 张涛, 崔宗均, 高丽娟, 康文启, 王小芬, 胡跃高. 绿汁发酵液和乳酸菌剂 MMD3 在不同含水率苜蓿青贮中的添加试验. *中国农业大学学报*, 2004, 9(5): 32-37.
ZHANG T, CUI Z J, GAO L J, KANG W Q, WANG X F, HU Y G. The effect of fermented green juice and silage inoculant bacteria MMD3 on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of China Agricultural University*, 2004, 9(5): 32-37.
- [13] 赵庆杰, 原现军, 郭刚, 闻爱友, 巴桑, 王奇, 沈振西, 余成群, 邵涛. 添加糖蜜和乳酸菌制剂对西藏青稞秸秆和多年生黑麦草混合青贮发酵品质的影响. *草业学报*, 2014, 23(4): 100-106.
ZHAO Q J, YUAN X J, GUO G, WEN A Y, BA S, WANG Q, SHEN Z X, YU C Q, SHAO T. Effect of adding an inoculant and molasses on fermentation quality of mixed silage of hull-lessbarley straw and perennial ryegrass in tibet. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(4): 100-106.
- [14] 赵苗苗, 玉柱. 添加乳酸菌及纤维素酶对象草青贮品质的改善效果. *草地学报*, 2015, 23(1): 205-210.
ZHAO M M, YU Z. Effects of lactic acid bacteria and cellulase on napier grass silages. *Acta Agrestia Sinica*, 2015, 23(1): 205-210.
- [15] 王丽学, 韩静, 陈龙宾, 霍文娟, 马毅, 刘景喜, 潘振亮, 范寰. 5 种乳酸菌对苜蓿青贮营养和发酵品质的影响. *饲料研究*, 2019(1): 1-5.
WANG L X, HAN J, CHEN L B, HUO W J, MA Y, LIU J X, PAN Z L, FAN H. Effects of five lactic acid bacteria on nutrition and fermentation quality of alfalfa silage. *Feed Research*, 2019(1): 1-5.
- [16] 卢强, 于浩然, 任志花, 贾玉山. 苜蓿青贮添加剂研究进展. *草原与草业*, 2018, 30(3): 1-4.
LU Q, YU H R, REN Z H, JIA Y S. Advances progress on alfalfa silage additives. *Grassland and Prataculture*, 2018, 30(3): 1-4.
- [17] 张涛, 李蕾, 张燕忠, 李胜利, 吴海忠, 崔宗均, 胡跃高. 青贮菌剂在苜蓿裹包青贮中的应用效果. *草业学报*, 2007(1): 100-104.
ZHANG T, LI L, ZHANG Y Z, LI S L, WU H Z, CUI Z J, HU Y G. The application effect of adding silage inoculants bacteria in *Medicago sativa* silages. *Acta Prataculturae Sinica*, 2007(1): 100-104.
- [18] 徐振上. 优良青贮剂菌株选育及对青贮饲料品质影响. 济南: 山东大学博士学位论文, 2018.
XU Z S. Selection of excellent inoculant strains and their effects on corn stoversilages. PhD Thesis. Ji'nan: Shandong University,

- 2018.
- [19] 胡朝辉. 青贮饲料中天然微生物的分离与乳酸菌抑菌研究. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2016.
HU Z H. The study of nature microorganism isolation from silage and lactic acid bacteria bacteriostasis. Master Thesis. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2016.
- [20] 李旺. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及纤维素酶基因的克隆与表达. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007.
LI W. Screen and identification of hot-resistant cellulose degrading bacterium, clone and expression of the cellulase gene. Master Thesis. Yangling: Northwest A & F University, 2007.
- [21] 张金霞, 乔红霞, 刘雨田. 水分和添加剂对紫花苜蓿青贮品质的影响. 草业科学, 2014, 31(4): 766-770.
ZHANG J X, QIAO H X, LIU Y T. Effects of moisture and additives on feed quality of alfalfa silage. Pratacultural Science, 2014, 31(4): 766-770.
- [22] 张子仪. 中国饲料学. 北京: 中国农业出版社, 2000.
ZHANG Z Y. Chinese Feedstuff Science. Beijing: China Agriculture press, 2000.
- [23] 刘屹峰. 革兰氏染色方法的改进. 鞍山师范学院学报, 2002, 4(1): 67-67.
LIU Q F. The improvement of the gram strain method. Journal of Anshan Normal University, 2002, 4(1): 67-67.
- [24] 牛化欣, 常杰, 胡宗福, 王思珍. 青贮微生物的发掘及其应用的研究进展. 动物营养学报, 2018, 30(11): 1-7.
NIU H X, CHANG J, HU Z F, WQNG S Z. Research progress on discovery and utilization of silage microbes. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(11): 1-7.
- [25] 李旭娇, 玉柱. 苜蓿青贮饲料中优良乳酸菌菌株的筛选. 中国奶牛, 2014(11): 37-40.
LI X J, YU Z. Filtering of excellent lactic acid bacteria strains from alfalfa silage. China Dairy Cattle, 2014(11): 37-40.
- [26] 韩吉雨. 青贮发酵体系中乳酸菌多样性的研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2009.
HAN J Y. Study on diversity of lactic acid bacteria in silage fermentation. PhD Thesis. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [27] 张慧杰, 玉柱, 王林, 蔡义民, 李峰, 陶雅, 孙启忠. 青贮饲料中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选. 草地学报, 2011, 19(1): 137-141.
ZHANG H J, YU Z, WANG L, CAI Y M, LI F, TAO Y, SUN Q Z. Isolation and identification of lactic acid bacteria from silage and filtering of excellent strains. Acta Agrectir Sinica, 2011, 19(1): 137-141.
- [28] 张涛. 紫花苜蓿青贮菌剂筛选、作用机理及其应用研究. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2005.
ZHANG T. Studies on screening, mechanism of action and application of alfalfa' silage inoculants bacteria. PhD Thesis. Beijing: China Agricultural University, 2005.
- [29] 席琳乔, 吴书奇, 史卉玲, 刘慧, 马春晖. 青贮玉米优良乳酸菌的分离与筛选. 贵州农业科学, 2016, 44(3): 102-105.
XI L Q, WU S Q, SHI H L, LIU H, MA C H. Isolation and identification of good lactic acid bacteria from silage maize. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(3): 102-105.
- [30] LARA E C, BASSO F C, DEASSIS F B, SOUZA F A, BERCHIELLI T T, REIS R A. Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. Animal Production Science, 2015, 56(11): 1867-1874.

(责任编辑 王芳)

本刊如有印装质量问题, 请将原杂志寄回编辑部, 由本部负责调换。