

多花黑麦草绿汁发酵液中 乳酸菌的分离鉴定

李 季, 杨春华, 贾露洁, 梁 欢, 郭丽娟, 刘 羽, 李攀峰

(四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625000)

摘要:为研究在多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)青贮中起主要作用的乳酸菌种类,从长江 2 号多花黑麦草调制的绿汁发酵液中分离得到 6 株乳酸菌(L-1、L-3、L-4、L-5、L-8 和 L-9)。经传统生理生化鉴定、产酸性试验、耐酸性试验、耐盐性试验及 16S rDNA 序列分析法最终确定,菌株 L-1 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),菌株 L-3 为乳酸乳球菌(*L. lactis*),菌株 L-4 为乳酸球菌(*L. garvieae*),菌株 L-5 为乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*),菌株 L-8 为魏氏菌(*Weissella confusa*),菌株 L-9 为魏氏菌(*W. cibaria*),且都具有良好的产酸性、耐酸性以及耐盐性,可进一步研发,作为青贮饲料添加剂。

关键词:多花黑麦草;绿汁发酵液;乳酸菌

中图分类号:S816.6

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2013)11-1866-05

* 1

多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)是禾本科黑麦属越年生牧草,其草质优良,柔嫩多汁,适口性好,是草食家畜的优良饲料^[1-2]。但其季节性较强,在生长旺盛的季节,南方地区多雨水天气,不宜调制干草,所以青贮是保存南方牧草的最佳方法^[3]。青贮是一种很好的饲料利用方式,可通过乳酸菌的增殖,将原料中的可溶性糖转化为乳酸类物质,创造酸性环境,抑制有害微生物的增殖,从而保存青贮饲料中的养分,达到饲料长期贮存的目的。但由于自然青贮效果较差,目前多向青贮原料中加入添加剂以促进发酵,而乳酸菌添加剂又被认为是其中的一种安全、无污染、低成本添加剂。绿汁发酵液作为一种天然的添加剂在一些试验中被验证其添加效果优于市面上的乳酸菌添加剂,但其不易储存,运输困难需现用现制,难以实现商品化^[4]。因此,从绿汁发酵液中分离鉴定起主要作用的菌株便有较为重要的意义^[5-7]。本研究以长江 2 号多花黑麦草为原料,分离、鉴定多花黑麦草绿汁发酵液中起主要作用的乳酸菌种类,观察其作为添加剂对多花黑麦草青贮品质的影响,并选育出优良菌株,研发出相应的乳酸菌添

加剂并进行推广利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 四川农业大学教学科研园区的长江 2 号多花黑麦草。

1.1.2 试剂 结晶紫染色液、碘液、复红乙醇溶液、80% 的无菌甘油、TE 缓冲液、10% SDS、20 mg · mL⁻¹ 蛋白酶 K、10 mol · L⁻¹ CTAB、5 mol · L⁻¹ NaCl、酚/氯仿/异戊醇试剂、氯仿/异戊醇试剂、异丙醇、70% 乙醇、灭菌去离子水和溴化乙锭。

1.1.3 培养基 采用 MRS 固体、液体和半固体培养基。液体培养基不加琼脂,半固体培养基琼脂含量为 4 g · L⁻¹,固体培养基琼脂含量为 20 g · L⁻¹,各种培养基在高压灭菌前均调节 pH 至 6.2~6.8。

1.1.4 仪器设备 高压灭菌锅、超净工作台、恒温水浴锅、高速离心机、振荡培养箱、电子显微镜、粉碎机、紫外分光光度计、电子天平、恒温水浴槽、凝胶成像分析系统、电热恒温培养箱、高速冷冻离心机、梯度基因扩增仪、电泳仪、酸度计和分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 绿汁发酵液的调制 将新鲜的多花黑麦草剪

* 收稿日期:2013-07-01 接受日期:2013-09-20

基金项目:国家科技支撑计划项目(2011BAD17800)

作者简介:李季(1992-),男,山东平度人,在读本科生,从事牧草生产与利用研究。E-mail:740562377@qq.com

通信作者:杨春华(1969-),女,四川平武人,教授,博士,从事草地生态研究。E-mail:ychh@sicau.edu.cn

碎,加入 2 倍质量的灭菌蒸馏水,用粉碎机粉碎 1 min 后用两层纱布过滤,加入 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖,分装于 100 mL 的容量瓶中密封,放入 30°C 恒温箱中厌氧培养 48 h^[8]。

1.2.2 乳酸菌的分离纯化及保存 在超净工作台上用接种环蘸取发酵好的绿汁发酵液,在配置好的 MRS 培养基上划线,然后将培养基密封放置于 37°C 恒温培养箱中培养 1~2 d^[9]。同时采用试管斜面培养法和无菌甘油保存法保存菌种^[10]。

1.2.3 菌种的生理生化鉴定 菌种鉴定先采用生理生化鉴定的方法来初步确定分离菌株的名称。生理生化鉴定根据凌代文和东秀珠^[11]的方法,通过不同乳酸菌的显色反应来初步确定该种乳酸菌的名称。

1.2.4 乳酸菌产酸能力的测定 将鉴定出的菌株分别接种至 pH 值为 6.2 的 MRS 液体培养基,置于 30°C 培养箱中培养 48 h,通过测定 pH 值来判断乳酸菌的产酸能力^[12]。

1.2.5 乳酸菌的耐酸试验 将鉴定出的菌株分别接种至 pH 值为 3.0 的 MRS 液体培养基,置于 30°C 培养箱中培养 48 h,在 660 nm 下测定菌液的吸光值,判断乳酸菌生长情况,从而推断其耐酸能力^[13]。

1.2.6 乳酸菌的耐盐试验 将鉴定出的菌株分别接种至 NaCl 浓度为 5%、7%、8%、9% 和 10% 的 MRS 培养基中,培养 2~5 d 后,测定乳酸菌的耐盐能力^[14]。

1.3 菌种的分子鉴定 最后用分子手段对这几种菌进行最终鉴定。分子手段步骤为用 DNA 试剂盒提取该菌的 DNA,在微量紫外分光光度计下检测 DNA 纯度,之后对乳酸菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,扩增结束后取扩增产物在琼脂糖凝胶上电泳,若观察到约 1 500 bp 的条带,则说明扩增成功。扩增成功的 PCR 产物由生物科技公司测序。测得 16S rDNA 序列后,在 NCBI 上用 BLAST 程序比对,从 GenBank 数据库中获得有关菌种的公认标准序列数据,并用 PHYLIP 软件包以 Neighbor Join 法绘制系统发育树。若序列同源性大于 97.5%,则可确定该种菌株^[5]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离筛选结果 从试验材料多花黑麦草的绿汁发酵液中分离出菌株若干,从中挑选革兰氏染色为阳性,形态整齐,有代表性的菌株若干

(图 1),进行生理生化鉴定。

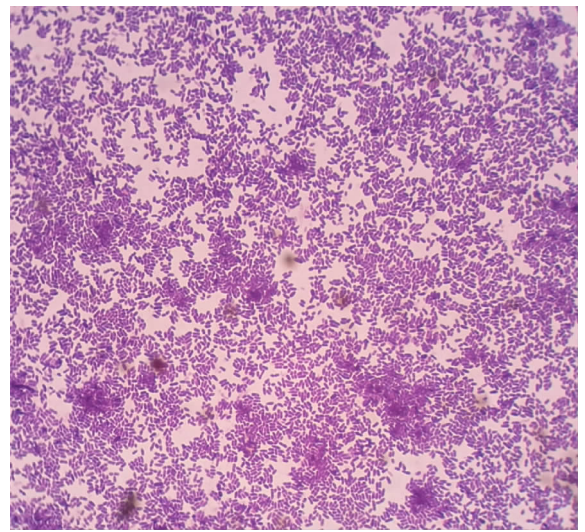


图 1 绿汁发酵液革兰氏染色镜检

Fig. 1 Gram staining microscopic examination for Previously Fermented Juice of Italian ryegrass

2.2 乳酸菌生理生化法鉴定结果 通过生理生化法,分离鉴定出 10 株不同乳酸菌。其中,乳酸杆菌两株,分别编号为 L-1、L-2;乳酸球菌 8 株,分别编号 L-3、L-4、L-5、L-6、L-7、L-8、L-9 和 L-10 (表 1)。

2.3 乳酸菌产酸能力的测定 初步鉴定所得 10 株菌均能在 48 h 内将 pH 值降为 3.4 以下,都具有良好的产酸能力,是良好的青贮菌种(表 2)。

2.4 乳酸菌的耐酸试验 通过乳酸菌耐酸试验,初步筛选所得 10 株菌在 pH 值为 3.0 的培养基上均能正常生长,OD_{660 nm} 值都大于 1.0,可知其繁殖速度较快,有利于青贮时快速繁殖出大量乳酸菌,促进发酵(表 3)。

由于生理生化法无法十分准确鉴定出乳酸菌的确切名称,所以将上述 10 株菌送往生物科技公司进行进一步的分子手段鉴定,即 16S rDNA 序列同源性分析。

2.5 乳酸菌的耐盐试验 通过耐盐性试验的测定,初步筛选出的 10 株菌在 5% 的 NaCl 环境下生长状况良好;在 7% 的环境下生长较正常,特别是 4 d 时菌株生长较好;在 8% 的环境下部分菌株出现生长较弱的情况;在 9% 和 10% 的环境下 10 株菌株都不能生长。可知所有菌株均可耐受 8% 的盐浓度(表 4)。

表 1 10 株菌株的碳水化合物发酵产酸试验

Table 1 Sugar fermentation test of 10 strains of lactic acid bacteria

鉴定项目 Item	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9	L-10
P-1	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+
P-2	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
P-3	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+
P-4	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
P-5	+	+	d	+	+	d	+	+	+	d
P-6	+	—	+	+	+	d	+	+	+	+
P-7	+	—	—	+	+	+	+	d	d	+
P-8	+	+	+	+	+	+	+	—	d	+
P-9	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
P-10	—	—	+	+	—	+	d	+	+	+

注:鉴定项目代号 P-1~P-10 分别代表蔗糖、甘露醇、山梨醇、乳糖、七叶苷、麦芽糖、棉籽糖、纤维二糖、水杨酸、鼠李糖。“+”代表阳性反应,“—”代表阴性反应,“d”代表弱阴性。L-1~L-10 分别表示分离鉴定出的 10 株不同乳酸菌。下同。

Note: The evaluation program code P-1~P-10 represent sucrose, mannitol, sorbitol, lactose, esculin, maltose, raffinose, cellobiose, salicylic acid, rhamnose. “+” Represents a positive reaction, “—” represents a negative response, “d” represents a weak negative. L-1~L-10 represent to different isolated bacteria strains. The same below.

表 2 10 株菌株的产酸能力测定

Table 2 Acid production rate of 10 strains

菌株 Strain	pH	菌株 Strain	pH
L-1	3.22	L-6	3.15
L-2	3.31	L-7	3.19
L-3	3.33	L-8	3.08
L-4	3.39	L-9	3.35
L-5	3.36	L-10	3.29

表 3 10 株菌株的耐酸试验

Table 3 Acid tolerance of 10 strains

菌株 Strain	OD _{660 nm}	菌株 Strain	OD _{660 nm}
L-1	1.187	L-6	1.135
L-2	1.163	L-7	1.170
L-3	1.126	L-8	1.142
L-4	1.097	L-9	1.124
L-5	1.099	L-10	1.117

表 4 10 株菌的耐盐试验

Table 4 Salt tolerance of 10 strains of lactic acid bacteria

菌株 Strain	5%		7%		8%		9%		10%	
	2 d	3 d	3 d	4 d	4 d	5 d	4 d	5 d	4 d	5 d
L-1	++	+++	++	+++	+	+++	—	—	—	—
L-2	+++	+++	++	+++	+	+++	—	—	—	—
L-3	+++	+++	+	+++	—	+	—	—	—	—
L-4	+++	+++	+	+++	—	+	—	—	—	—
L-5	+++	+++	+	+++	—	+	—	—	—	—
L-6	+++	+++	++	+++	+	+++	—	—	—	—
L-7	+++	+++	+	+++	+	++	—	—	—	—
L-8	+++	+++	+	+++	+	++	—	—	—	—
L-9	+++	+++	+	+++	—	+	—	—	—	—
L-10	+++	+++	+	+++	—	+	—	—	—	—

注:“—”表示菌株不能生长;“+”表示菌株生长状况较弱,“++”或“+++”表示菌株生长状况较好。

Note: “—” indicates no growth; “+” indicates weak growth; “++” and “+++” indicates good growth.

2.6 分子手段鉴定结果

2.6.1 PCR 扩增结果 对乳酸菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,扩增结束后取扩增产物在琼脂糖凝胶上电泳,均观察到约 1 500 bp 的条带(图 2),说明扩增成功。

2.6.2 最终测序结果 测得 16S rDNA 序列后,在 NCBI 上用 BLAST 程序比对,从 GenBank 数据库中 获得有关种的公认标准序列数据,最终确定 6 株菌种名称(表 4)。

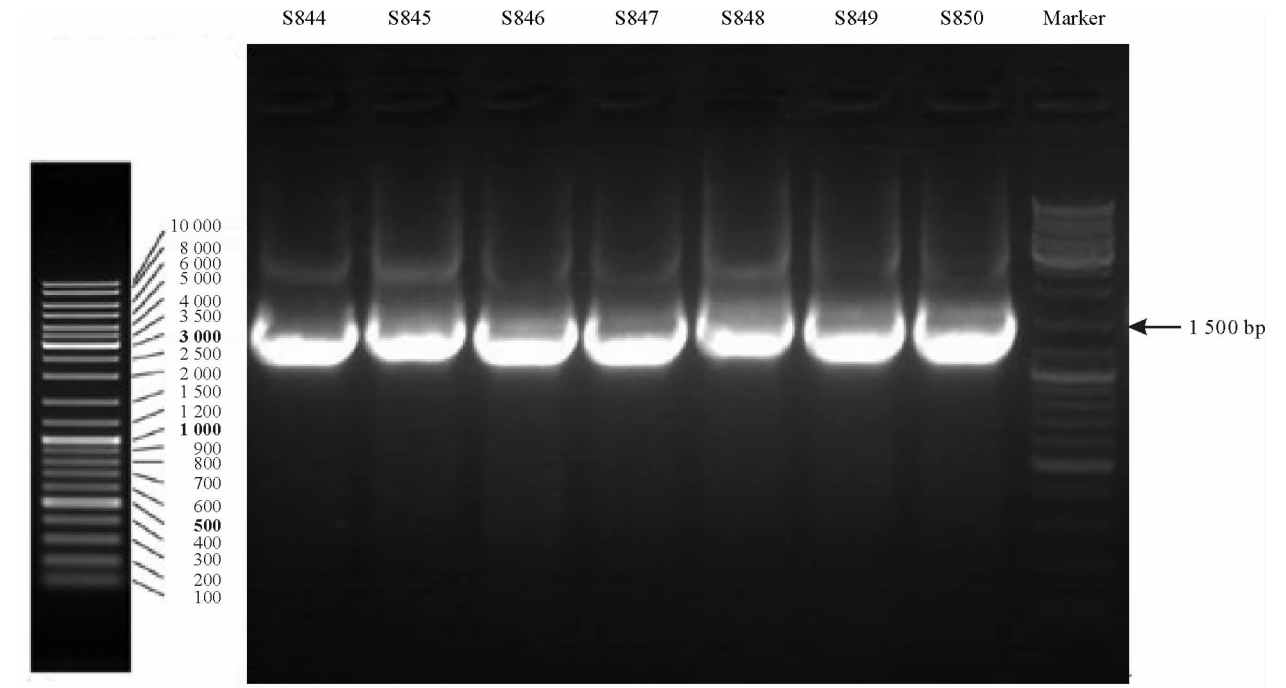


图 2 PCR 扩增结果
Fig. 2 The results of PCR amplifying

表 5 6 株菌的分子鉴定
Table 5 Molecular identification of 6 strains of lactic acid bacteria

菌株 Strain	名称 name
L-1	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>
L-3	乳酸乳球菌 <i>Lactococcus lactis</i>
L-4	乳酸球菌 <i>Lactococcus garvieae</i>
L-5	乳酸明串株菌 <i>Leuconostoc lactis</i>
L-8	魏氏菌 <i>Weissella confusa</i>
L-9	魏氏菌 <i>Weissella cibaria</i>

3 讨论与结论

乳酸菌在青贮发酵过程中起着至关重要的作用,其种类不同,作用的大小也有所不同。16S rDNA 具有功能与进化上的同源性,其序列进化变异频率缓慢,在结构上极具保守性,且分子大小适中,携带着充足的生物信息。因此,16S rDNA 序列分析法已成为一种鉴定微生物种类的标准方法^[14-16]。本研究运用 MRS 培养基分离培养长江 2 号多花黑麦

草绿汁发酵液中的乳酸菌,并采用传统生理生化鉴定法初步鉴定出 10 株菌株,最终根据 16S rDNA 序列分析法确定 10 株菌株中有重复,实际鉴定菌株为 6 株。其中含 1 种乳酸杆菌:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 5 种乳酸球菌:乳酸球菌(*L. garvieae*)、乳酸乳球菌(*L. lactis*)、魏氏菌(*Weissella confusa*)、魏氏菌(*W. cibaria*)和乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*)。6 株菌全为同型发酵乳酸菌,都具有较强的产酸性、耐酸性和耐盐性。在青贮中,需要添加能迅速降低 pH 值以达到抑制有害菌生长,长期保存饲料营养的菌株^[17],以上 6 种菌具备上述条件,可作为制作多花黑麦草青贮的良好添加剂,用以提高其青贮品质,拥有较高的利用价值。但张涛等^[18]通过不同发酵类型的乳酸菌制剂对青贮的品质影响的研究表明,异型发酵乳酸菌对青贮的有氧稳定性有明显的提升作用,应用时可混合添加。
刘哈璐^[10]对牧草青贮品质的研究表明,添加乳

酸菌可以改善试验牧草青贮发酵品质,其中球菌加杆菌组合处理组对牧草青贮品质改善效果最优,可将鉴定出的菌株按不同比例球菌加杆菌搭配组合添加至青贮中,研究其在实际青贮过程中对多花黑麦草青贮发酵品质的影响。

参考文献

- [1] 赵政,陈学文,朱梅芳,等. 添加乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆青贮饲料品质的影响[J]. 广西农业科学, 2009, 40(7): 919-922.
- [2] 张子仪. 中国饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 334.
- [3] 陈修鸾,曹成禹,李名远. 常用饲料和牧草栽培技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1987: 38-39.
- [4] 于文,高升. 绿汁发酵液对青贮发酵品质影响的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2006, 29(5): 242-243.
- [5] 赵辉,关颖,夏道丽,等. 从玉米秸秆青贮饲料中分离发酵戊糖乳酸菌的研究[J]. 饲料研究, 2011(2): 28-29, 39.
- [6] 季昀,潘晓花,王龙,等. 玉米添加剂研究进展[J]. 广东饲料, 2011, 20(2): 27-29.
- [7] 赵芸君,李学森,董志国,等. 绿汁发酵液及青贮苜蓿中乳酸菌的分离筛选及鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 29-33.
- [8] 张涛,崔宗均,高丽娟,等. 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[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(5): 32-37.
- [9] 热娜·米吉提, 乌斯满·依米提, 周秀文, 等. 饲料乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 生物技术通报, 2012(6): 166-173.
- [10] 刘哈璐. 禾本科牧草乳酸菌发现及发酵品质检测与动物生产性能影响研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [11] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 33-115.
- [12] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2007(4): 753-756.
- [13] 司丙文, 王宗礼, 孙启忠, 等. 山竹岩黄芪青贮中优质乳酸菌的分离和鉴定[J]. 草地学报, 2012(1): 166-170.
- [14] 葛红莲, 郭翠红, 张军令, 等. 两株乳酸菌的分离鉴定及产酸性能的研究[J]. 周口师学报, 2009, 26(2): 89-91.
- [15] 张家超, 孙志宏, 刘文俊, 等. 适用于乳酸菌分类鉴定的分子生物学技术[J]. 乳业科学与技术, 2009(2): 89-93.
- [16] 曾影, 郇树乾. 发酵促进型牧草青贮添加剂研究进展[J]. 中国畜禽种业, 2011(5): 73-76.
- [17] 李晓霞. 不同添加剂对八种牧草青贮效果的影响[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2008.
- [18] 张涛, 崔宗均, 李建平, 等. 不同发酵类型青贮菌制剂对青贮发酵的影响[J]. 草业学报, 2005, 14(3): 67-71.

Isolation and identification of lactic acid bacteria from previously fermented juice of Italian ryegrass

LI Ji, YANG Chun-hua, JIA Lu-jie, LIANG Huan, GUO Li-juan, LIU Yu, LI Pan-feng

(Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University College, Ya'an 625000, China)

Abstract: In order to study lactic acid bacteria species which plays a major role in the fermentation process of Italian ryegrass(*Lolium multiflorum*) silage, 6 lactic acid bacteria strains(L-1, L-3, L-4, L-5, L-8 and L-9) were isolated from previously fermented juice of Changjiang No. 2 Italian ryegrass. The results of traditional biochemical identification, experiment of acid-production rate, acid tolerance test, salt tolerance test, and the 16S rRNA sequence analysis indicated that L-1, L-3, L-4, L-5, L-8 and L-8 are *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc lactis*, *Weissella confuse* and *Weissella cibaria*, respectively, and all of them have good acid productivity, strong acid and salt tolerance. Further studies on using these strains as feed additives can be made.

Key words: Italian ryegrass; isolation; previously fermented juice