

徐 婷,崔占鸿,钟 瑾,等. 青海省部分地区人工种植燕麦青贮乳酸菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):205-208.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.066

青海省部分地区人工种植燕麦青贮乳酸菌的筛选

徐 婷¹,崔占鸿^{1,2},钟 瑾³,骆爱群³,陶 勇³,刘书杰^{1,2}

(1. 青海大学畜牧兽医科学院/青海省放牧家畜营养与生态国家重点实验室培育基地/青海省高原放牧家畜动物与饲料科学重点实验室,青海西宁 810016;2. 青海省畜牧兽医科学院/青海高原牦牛研究中心,青海西宁 810016; 3. 中国科学院微生物研究所,北京 100101)

摘要:以青海高寒地区分布范围广、种植面积大、饲用价值较高的燕麦为对象,对其附着乳酸菌进行分离、鉴定,发现适合青海地区人工种植燕麦青贮的乳酸菌包括 B74(植物乳杆菌)、B101(植物乳杆菌)、GC10(植物乳杆菌)、R2(干酪乳杆菌)、HT4(片球菌)、PP(片球菌)、D1404(粪产球菌或戊糖片球菌)。

关键词:青海省;高寒地区;燕麦;青贮乳酸菌;筛选;菌落形态;菌株类型;青贮试验

中图分类号: S816.5⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0205-04

青海省是我国五大牧区之一,牧草的需求量非常大^[1]。近年来,燕麦开始在牧区大量种植,已成为高寒牧区枯草季节的重要饲草来源。人工种草制作青贮饲料,是解决高寒草地畜牧业冬春季节饲草料严重不足的有效措施之一^[2]。乳酸菌在饲料工业中,尤其在青贮饲料的制备领域中有重要的作用^[3-7]。青海高寒牧区的极端气候环境使得传统商品化乳酸菌在该地区的应用受到了限制,很难调制出品质良好的青贮饲料。因此,发掘和利用高寒地区乡土产乳酸菌种质资源,对于在该地区制作青贮饲料具有重要的实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 青海省贵南草业有限公司种植的青燕 3 号燕麦及表层土样,采集于青海省贵南县过马营镇,海拔约 3 300 m;青海海北州高原现代生态畜牧业科技试验示范园种植的加拿大燕麦及表层土样,采集于青海省海晏县,海拔约 3 200 m。

1.1.2 仪器 恒温培养箱、超净工作台、超低温冰箱、高压蒸汽灭菌锅、振荡器、pH 计、天平、光学显微镜、PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪、液相色谱仪,紫外分光光度计。

1.1.3 试剂 MRS 培养基(参考中国科学院微生物研究所的配方):酵母粉 15 g/L,葡萄糖 60 g/L,酪蛋白胨 30 g/L,柠檬酸氢二胺 6 g/L,乙酸钠 15 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, MnSO_4 0.75 g/L,吐温-80 3 mL/L, K_2HPO_4 6.0 g/L,牛肉膏 30 g/L,琼脂 15 g/L。113 ℃,30 min 高压蒸汽灭菌,每平皿约 20 mL。

MC 培养基(参考中国科学院微生物研究所的配方):大豆蛋白胨 5 g/L,牛肉膏 3 g/L,酵母粉 3 g/L,葡萄糖 20 g/L,

乳糖 20 g/L,琼脂 15 g/L。121 ℃,20 min 高压蒸汽灭菌,每平皿约 20 mL。

镜检(采用 G⁺染色):草酸铵结晶紫,碘液,番红。

凝胶电泳:琼脂糖,TBE 缓冲液,StarSpin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,阳性对照菌种为大肠杆菌。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 取自然发酵的青贮饲料 500 g 左右密封保存,于 4 ℃保存备用。

1.2.2 青贮饲料中菌群结构分析 试验分为 4 组:第 I 组编号 GC(贵南燕麦青草样)、第 II 组编号 GT(贵南燕麦地表层土样)、第 III 组编号 HY(海晏燕麦青草样)、第 IV 组编号 HT(海晏燕麦地表层土样)。取乳熟期整株燕麦减碎至 1~2 cm,混匀称重,土捏碎称取 3 g,加 10 倍的已灭菌的生理盐水浸泡 2 h,使表层含有的菌游离于生理盐水中,整个过程在无菌室中进行。

将浸泡草样及土样的液体置于振荡器上振荡使菌均匀分布,分别取菌液作梯度稀释液: 10^{-1} ~ 10^{-5} 。取稀释液在 MRS 培养基(添加制霉菌素 50 mg/mL 以抑制霉菌和酵母菌的生长)平板上涂布,每个稀释梯度取 200 mL 涂布 3 皿,涂布完成后置于 37 ℃温箱中培养 48 h。

1.2.3 菌落形态特征观察 平板计数后,根据公式计算燕麦附着乳酸菌的活菌数(CFU/g):活菌数=(同一稀释度的重复平板上菌落平均数×稀释倍数)/含菌样品质量。计数后进行菌落形态观察,并描述各菌株的菌落形态特征。

1.2.4 细菌革兰氏染色观察 挑取典型菌落,进行革兰氏染色、镜检,挑取培养 48~72 h 的菌落涂片,进行革兰氏染色,100 倍油镜观察。

革兰氏染色法:取 10 μL 水于载玻片中央,再用接种环挑取少量菌落与载玻片上的水滴均匀混合并涂成薄的菌膜自然干燥,玻片向上在乙醇灯上快速烤干,结晶紫初染 1 min 后用水充分淋洗,滴加碘液媒染 1~2 min 水洗,用水充分淋洗后用吸水纸吸干水分,用 95%乙醇脱色 20 s 并水洗,番红复染 1~2 min 水洗,自然干燥 100 倍油镜观察。蓝紫色为革兰氏阳性菌,红色为革兰氏阴性菌。

1.2.5 乳酸菌的分离和纯化 根据菌落的颜色、大小、光泽、

收稿日期:2014-04-09

基金项目:青海省科技厅项目(编号:2010-N-516)。

作者简介:徐 婷(1986—),女,湖北孝感人,硕士研究生,从事反刍动物营养研究。E-mail:xutinghubei@163.com。

通信作者:刘书杰,研究员,硕士生导师,从事反刍动物营养研究。E-mail:mkyshj@126.com。

透明程度等挑取有透明圈的单菌落,进行革兰氏染色、油镜镜检,凡是疑似为乳酸菌并以划线的方式在 MRS 培养基上继续分离纯化培养 2 次。如果镜检发现不纯,就继续划线纯化,直至纯化为止。将纯化后的菌株接种到 MRS 液体培养基上培养,再将菌液接种到保存液(含 60% 甘油,体积为 1 : 1)中,并在 - 80 ℃ 条件下保存备用。

1.2.6 乳酸菌的初步筛选 将鉴定过的乳酸菌分别按 3% 的接种量转入 MRS 液体培养基中,37 ℃ 恒温培养,每隔 2 h 测定不同菌株发酵液 pH 值,绘制的产酸速率曲线即不同发酵时间(h)所对应发酵液 pH 值的变化曲线,根据不同菌株的产酸能力以及产酸速率来筛选适宜的用作青贮饲料的菌株。用待测菌株培养 24 h 的培养液,以 3% 的接种量接入 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养箱中培养 48 h,以培养基为空白,在 620 nm 下测定样品的吸光度。

1.2.7 优良乳酸菌的菌种鉴定 优良乳酸菌的菌种鉴定采用 16S rRNA 序列测定,即分离的乳酸菌在 MRS 培养基中培养 8 h 后进一步纯化并进行菌株 DNA 的提取,DNA 提取试剂盒由天根生化试剂(北京)有限公司提供,DNA 提取及纯化按照试剂盒使用方法进行。

2 结果与分析

2.1 分离菌株菌落形态及菌体细胞形态观察

由表 1 可以看出,所筛菌种大多为中等大小、中间凸起、表面光滑的白色菌落。

2.2 乳酸菌的初步筛选

从 pH 值下降快、生长速度快指标进行筛选,初筛出菌号为 R2、R6、HC58、HC64、HT4、HT2、GC10、GC21、GC26、GC44、B29、B74、B90、B101 的菌(表 2)。

2.3 细菌革兰氏染色观察

图 1 显示,所选菌大多为杆菌,1 个或成对出现。

2.4 优良乳酸菌的筛选

将 pH 值下降快、生长速度快的菌株进行实验室小规模模拟青贮试验,其 pH 值测定结果见表 3,其中编号为 R2、HT4、GC10、GC44、B101、D1404、YX 的 pH 值下降快且稳定,可用于袋贮青贮试验。

2.5 青贮菌种鉴定结果

筛选出的优势菌种经测序后冷冻干燥制成菌剂,并测定其活菌数,筛选出的菌种情况见表 4。

3 结论与展望

以青海高寒地区分布范围广、种植面积大、饲用价值较高的燕麦为原料,对其附着乳酸菌进行分离、鉴定,发现适合青海地区人工种燕麦青贮的乳酸菌包括 B74(植物乳杆菌)、B101(植物乳杆菌)、GC10(植物乳杆菌)、R2(干酪乳杆菌)、HT4(片球菌)、PP(片球菌)、D1404(粪产球菌或戊糖片球菌)。

畜牧业是青海的支柱产业,但是目前青海草场退化、草畜不平衡、自然灾害频发,一直制约着青海畜牧业发展,而青贮饲料是解决青海牧区饲草不平衡的有效措施之一。目前,我国对青贮饲料的调制主要利用国外商业化的乳酸菌制剂,但是在青海高寒地区燕麦收获季节的气温大概在 15 ℃ 左右,低

表 1 菌落形态

菌株编号	菌落形态	生长速度
GC1	大,凸起,白色,边缘光中央皱	+++
GC2	中等大小,凸起,白色,光面	++
GC3	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC4	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC5	中等大小,较平,浅黄色,光面	++-
GC6	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC7	中等大小,凸起,白色,光面	+
GC8	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC9	中等大小,凸起,白色,蜡质	++-
GC10	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC11	中等大小,凸起,白色,光面	+
GC12	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC13	中等大小,凸起,白色,光面	+++
GC14	中等大小,凸起,白色,光面	+++
GC15	中等大小,凸起,白色,边皱	+-
GC16	中等大小,凸起,白色,边皱	+
GC17	中等大小,凸起,白色,边皱	+-
GC18	中等大小,凸起,白色,光面	++
GC19	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC20	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC21	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC22	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC23	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC24	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC25	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC26	中等大小,凸起,白色,光面	++-
GC27	中等大小,中凸起,白色,中皱	
GC28	中等大小,中凸起,浅黄,中皱	+
GC29	中等大小,中凸起,浅黄,中皱	+
GC30	小,凸起,白色,光面	++-
GC31	小,凸起,白色,光面	++-
GC32	小,凸起,白色,光面	++-
GC33	小,凸起,浅黄色,光面	++-
GC34	较小,凸起,白色,光面	+++
GC35	较小,浅黄色,白色,光面	
GC36	小,凸起,白色,光面	++-
GC37	小,凸起,浅黄色,光面	++-
GC38	小,凸起,浅黄色,光面	+++
GC39	小,凸起,浅黄色,光面	
GC40	小,凸起,浅黄色,光面	+++
GC41	极小,凸起,浅黄色,光面	+++
GC42	中等偏大,较平,浅黄,中皱	+++
GC43	中等偏大,较平,浅黄色,中皱	+++
GC44	中等偏大,较平,浅黄色,中皱	++-
GC45	中等偏大,较平,浅黄色,中皱	++-
GC46	中等偏大,较平,浅黄色,中皱	++-
GC47	较大,中凸起,白色,蜡质面	++-
GC48	较大,中凸起,白色,蜡质面	+
HT1	中等偏大,凸起,黄色,光面	++
HT2	中等偏大,凸起,白色,光面	++-
HT3	小,凸起,黄色,光面	+-
HT4	中等大小,凸起,黄色,光面	++-
HT5	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HT6	中等大小,凸起,黄色,光面	++

续表 1

菌株编号	菌落形态	生长速度
HC1	大,较平,黄色,光面	+
HC2	大,较平,白色,光面	+
HC3	大,较平,白色,光面	+
HC4	大,较平,浅黄色,光面	+
HC5	中等,凸起,白色,光面	+
HC6	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC7	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC8	小,凸起,浅黄色,光面	-
HC9	小,凸起,浅黄色,光面	-
HC10	小,凸起,白色,光面	-
HC11	很小,凸起,白色,光面	+
HC12	中等大,凸起,黄色,光面	+
HC13	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HC14	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HC15	中等大小,凸起,黄色,光面	-
HC16	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC17	中等大小,凸起,白色,光面	-
HC18	中等偏大,凸起,黄色,光面	+
HC19	中等偏大,凸起,黄色,光面	+
HC20	中等偏大,凸起,黄色,光面	+
HC21	中等偏大,凸起,白色,光面	+
HC22	中等偏大,凸起,白色,光面	+
HC23	中等偏大,凸起,白色,光面	+
HC24	中等偏大,凸起,白色,光面	+
HC25	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HC26	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HC27	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC28	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC29	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC30	中等大小,凸起,白色,光面	+
HC31	中等大小,凸起,黄色,光面	+
HC32	小,凸起,白色,光面	+
HC50	大,平,浅黄色,光面	++
HC51	大,中凸起,白色,蜡质面	+++
HC52	大,中凸起,白色,光面	+++
HC53	大,中凸起,白色,光面	+++
HC54	大,中凸起,白色,光面	+-
HC55	大,中凸起,白色,蜡质面	+++
HC56	中等,平,透,黄色,光面	+
HC57	中等,中凸起,浅黄,光面	+++
HC58	大,平,白色,光面	+++
HC59	中等,平,透,黄色,光面	+
HC60	中等,凸起,浅黄色,光面	-
HC61	中等,平,黄色,光面	+
HC62	中等偏小,凸起,白色,光面	
HC63	中等,凸起,黄色,光面	-
HC64	中等,凸起,浅黄色,光面	++
HC65	大,平,黄色,光面	++

表 2 初筛菌的产酸及生长速度测定

菌株编号	初始 pH 值	培养 30 h		培养 48 h	
		<i>D</i> _{620 nm}	pH 值	<i>D</i> _{620 nm}	pH 值
R2		0.034	3.0	1.501	2.5
R4		0.034	3.0	1.293	2.5
R6		0.034	3.0	1.421	2.5
HC13	5.5	0.543	5.0	0.364	4.5
HC50	5.5	0.610	4.5	0.461	4.0
HC51	5.5	0.405	4.0	0.691	4.0
HC52	5.5	0.423	4.0	0.815	4.0
HC53	5.5	0.402	4.0	0.626	4.0
HC54	6.5	0.273	5.0	0.462	4.0
HC55	6.0	0.406	4.0	0.765	4.0
HC57	6.0	0.436	4.0	0.727	4.0
HC58	5.0	0.306	3.5	0.687	3.5
HC64	5.0	0.251	3.5	0.584	3.0
HT1	6.0	0.311	4.0	0.603	3.5
HT2	5.0	0.333	3.5	0.719	3.0
HT4	5.0	0.383	3.5	0.723	3.0
HT6	5.0	0.296	4.0	0.583	3.5
GC1	6.0	0.330	4.5	0.638	4.0
GC3	5.0	0.321	4.5	0.632	4.0
GC4	6.0	0.324	4.0	0.498	4.0
GC5	6.0	0.328	4.0	0.502	3.5
GC6	5.5	0.358	4.0	0.545	3.5
GC8	5.0	0.353	4.0	0.457	3.5
GC9	5.5	0.383	3.5	0.597	3.5
GC10	5.0	0.353	3.5	0.851	3.5
GC12	5.0	0.366	4.0	0.59	3.5
GC13	5.0	0.357	4.0	0.697	3.5
GC14	5.0	0.349	3.5	0.669	3.5
GC17	6.0	0.303	4.0	0.672	4.0
GC19	5.0	0.364	3.5	0.720	3.5
GC20	5.0	0.346	3.5	0.713	3.5
GC21	5.5	0.353	3.5	0.703	3.5
GC22	5.0	0.344	3.0	0.663	3.5
GC23	5.5	0.360	3.5	0.676	3.5
GC25	5.0	0.354	3.5	0.587	3.5
GC26	5.0	0.382	3.5	0.728	3.5
GC29	5.0	0.356	3.5	0.693	3.5
GC31	5.0	0.364	3.5	0.501	3.5
GC32	5.5	0.332	4.0	0.681	4.0
GC33	5.5	0.347	3.5	0.625	3.5
GC34	5.5	0.343	3.5	0.609	3.5
GC36	5.5	0.359	3.5	0.667	3.5
GC37	5.0	0.353	3.5	0.668	3.5
GC38	5.0	0.363	4.0	0.624	3.5
GC40	5.5	0.348	4.0	0.613	3.5
GC41	5.0	0.355	4.0	0.679	3.5
GC42	5.0	0.339	3.5	0.645	3.5
GC43	5.5	0.387	4.0	0.756	3.5
GC44	5.0	0.375	3.5	0.732	3.5
GC45	5.0	0.357	3.5	0.689	3.5
GC46	5.0	0.342	3.5	0.673	3.5
GC47	5.5	0.344	5.0	0.703	4.0
A75	4.0	0.855	2.5	1.399	2.5
B29	4.0	1.000	2.5	1.512	2.5
B74	4.0	0.880	2.5	1.300	2.5
B90	4.0	1.090	2.5	1.447	2.5
BI01	4.0	1.019	2.5	1.450	2.5
对照组	6.0	0.068	6.0	0.105	6.0

于商品化常规乳酸菌制剂中乳酸菌的适宜生长温度(25 ℃),使得常规的商品化乳酸菌制剂很难在当地调制出品质良好的青贮饲料^[8]。因此,发掘适合青海高寒牧区乳酸菌种质资源对在该地区制作青贮饲料具有重要的实践意义,同时也为有效保护和开发利用我国极端环境中的乳酸菌种质资源提供宝贵的基础数据和科学依据。

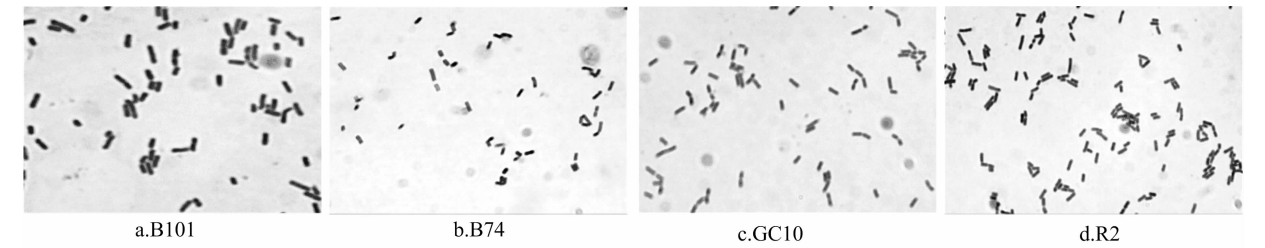


图1 部分菌 G⁺ 染色后油镜检结果

表 3 实验室小袋青贮试验 pH 值变化情况

菌株编号	青贮不同时间后的 pH 值								
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	13 d	20 d	30 d
LC	3.50	6.23	4.83	5.15	4.50	5.25	5.27		8.09
R2	3.50	3.98	4.38	4.06	4.39	4.18	4.44	5.20	4.16
R6	4.00	5.32	4.77	4.58	5.38	5.23	5.08	5.38	8.20
HT2	4.00	4.17	5.01	4.46	4.31	4.56	5.65		8.07
HT4	3.50	5.64	4.18	5.95	4.67	4.42	4.86	4.53	7.22
HC58	3.50	5.76	5.31	5.60	4.89	5.22	4.45	5.60	7.90
HC64	3.50	4.71	6.30	4.76	4.79	5.53	4.55	5.15	7.77
GC10	3.50	4.27	3.93	4.97	3.61	4.37	4.32	4.81	8.19
GC21	3.50	4.69	4.18	4.37	4.30	4.34	5.36	5.64	8.12
GC26	3.50	5.36	4.74	4.86	5.01	4.91	5.25		8.09
GC44	3.50	5.20	4.35	4.36	4.43	4.67	4.91	6.67	7.84
B29	3.50	5.15	6.20	4.60	5.06	5.67	5.40		8.15
B74	3.50	5.77	4.74	5.34	4.74	5.13	4.88	7.32	7.61
B101	3.50	4.51	4.26	4.40	4.21	4.67	4.34	4.77	8.04
A3101	4.00	5.01	5.31	5.02	5.13	5.75	4.81	7.44	7.99
B1201	4.00	4.85	5.51	4.41	4.81	5.11	5.62		8.19
C1303	3.50	4.88	5.33	6.69	4.68	5.44	5.21		8.00
D1404	3.50	4.54	4.79	4.50	4.34	4.58	4.42	5.39	6.15
YX	3.50	4.07	4.10	4.21	4.27	4.22	4.55	5.82	7.01
snow	4.00	5.20	5.02	5.61	4.86	4.79	4.55	5.28	8.64
CK	5.92	6.64	4.95	5.45	5.04	5.35	5.22	6.07	6.82
NS	7.12	5.48	4.94	4.19	4.66	4.48	4.90	4.91	7.48

注:LC、R2、R6 为已知乳酸菌,用于与所筛菌作对比,B29、B74、B101、A3101、B1201、C1303、D1404 为 2012 年从青贮饲料中筛出的优势菌,YX、snow 为商品菌剂,CK、NS 分别为空白对照和加生理盐水后的对照。

表 4 所筛菌种鉴定结果及所制菌剂活菌数

菌株编号	菌株类型	活菌数(CFU/g)
B74	植物乳杆菌	4.31×10^{11}
B101	植物乳杆菌	1.49×10^8
GC10	植物乳杆菌	6.40×10^{10}
R2	干酪乳杆菌	6.41×10^{11}
HT4	片球菌	3.73×10^{11}
PP	片球菌	1.07×10^{11}
D1404	粪产球菌或戊糖片球菌	1.00×10^8
YX	商品混合菌(台湾亚芯)	1.00×10^8

参考文献:

[1]尚 拜. 青海省草地资源概况[J]. 养殖与饲料,2010(11): 93-95.
[2]李梦寒. 藏东南乳酸菌青贮添加剂的研究与应用[D]. 拉萨:西藏大学,2009.
[3]Gordon F J. Improving the feeding value of silage through biological

control[C]//Proceedings of the All-tech European Lecture Tour, 1992:2-17.
[4]Cai Y, Ohmomo S, Kumai S. Distribution and lactate fermentation characteristics of lactic acid bacteria on forage crops and grasses[J]. J Grassl Science,1994,39:420-428.
[5]Cai Y, Ohmomo S, Ogawa M, et al. Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage[J]. Journal of Applied Microbiology,1997,83(3): 307-313.
[6]Sanderson M A. Aerobic stability and in vitro fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages[J]. J Anim Science, 1993,71:505-514.
[7]Weinberg Z G, Ashbell G, Hen Y, et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages[J]. J Appl Bacteriol,1993,75:512-518.
[8]张 琳,德科加. 青藏高原特种青贮牧草的品质评定试验[J]. 青海畜牧兽医杂志,2007,37(1):15-16.