

奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解菌的分离鉴定

王炳晓,柴同杰,苏鹏程,吕 静,姚美玲,戈胜强,秦 梅

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

【摘要】【目的】从奶牛瘤胃液中分离出具有分解纤维素能力的兼性厌氧细菌,用于绿色粗饲料微生物添加剂的研发。**【方法】**从奶牛瘤胃中采取瘤胃液,接种于羧甲基纤维素钠平板,采用严格厌氧结合需氧培养方式进行培养,通过刚果红染色,筛选出分解纤维素能力强的兼性厌氧细菌;采用生化试验结合 16S rDNA 序列分析方法对细菌进行鉴定,并绘制系统发育树;同时对细菌生长特性及有无致病性进行初步测定。**【结果】**共分离到 63 株具有分解纤维素能力的细菌,其中 29 株有较强的分解纤维素能力,包括 24 株 G⁻ 菌,5 株 G⁺ 菌;24 株 G⁻ 细菌中,18 株为肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种,3 株为铜绿假单胞杆菌,2 株为大肠杆菌,1 株为产酸克雷伯氏菌;5 株 G⁺ 细菌中,2 株与苏云金芽孢杆菌有 99.7% 的同源性,2 株与巨大芽孢杆菌有 99.6% 的同源性,1 株与蜡状芽孢杆菌有 99.5% 的同源性,分类学上可分别归于苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌。细菌的生长特性及致病性试验表明,分离到的细菌在 20~41 ℃、pH 5.0~9.0 条件下生长良好,肺炎克雷伯氏菌、苏云金芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌无致病性。**【结论】**分离到的奶牛瘤胃兼性厌氧细菌,可用于绿色粗饲料微生物添加剂的研发。

【关键词】 奶牛;瘤胃液;纤维素分解菌;16S rDNA;克雷伯氏菌;芽孢杆菌

【中图分类号】 S852.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)03-0035-08

Isolation and identification of cow ruminal facultatively anaerobic cellulolytic bacteria

WANG Bing-xiao, CHAI Tong-jie, SU Peng-cheng, LÜ Jing,
YAO Mei-ling, GE Sheng-qiang, QIN Mei

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract:【Objective】 This investigation was conducted to screen facultatively anaerobic cellulolytic bacteria separated from cow ruminal fluid for exploiting Microbial Feed Additives. 【Method】 Ruminal fluid was spread aseptically on sterilized CMC-Na agar plates, then the plates were incubated under the anaerobic conditions. The isolates dyed by Congo red to form big transparent haloes surrounding the individual colony were selected for identifying. Biochemical characterization and 16S rDNA sequence analysis were used for the classification of the strains. Physiological properties and pathogenicity were also preliminarily studied. 【Result】 Out of 63 isolated cellulolytic strains, 29 exhibited strong abilities in decomposing cellulose. Among 24 Gram-negative isolates, 18 strains were classified as *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Escherichia coli* and 1 *Klebsiella oxytoca*. Of 5 Gram-positive isolates, 2 strains belonged to *Bacillus thuringiensis*, 2 *Bacillus megaterium* and 1 *Bacillus cereus*. The screened strains required the most moderate culture conditions at temperature (20—41 ℃) and pH (5—9). Study of pathogenicity indicated that the 3 kinds of isolated bacteria could not cause the death of rats. 【Conclusion】 The results sug-

* [收稿日期] 2008-04-16

[基金项目] 山东农业大学博士后基金项目

[作者简介] 王炳晓(1980—),男,山东莱州人,在读硕士,主要从事环境微生物与分子细菌学研究。E-mail:linger_97@163.com

[通信作者] 柴同杰(1957—),男,山东德州人,教授,博士生导师,主要从事环境微生物与分子细菌学研究。

E-mail:chaitj117@163.com

gested that the isolated strains could become candidates for Microbial Feed Additives.

Key words: cow; ruminal fluid; cellulolytic bacterium; 16S rDNA; *Klebsiella* bacterium; *Bacillus* bacterium

我国是一个农业大国,农作物秸秆年总产量约 7 亿 t,但用作家畜饲料的仅占 15%~20%,大部分秸秆被用作燃料或还田。由于秸秆燃烧热能利用率极低(在 10%以下),而还田过程中伴随有物质转化和能量损失,并且分解缓慢,因此这 2 种秸秆利用方式,对于人类而言是巨大的资源浪费。另外,农作物秸秆在作为粗饲料利用的过程中,还存在有营养缺陷:家畜采食量低,体内消化率低,养分不平衡(低 N、低 Ca、低 P、低葡萄糖物质),这就造成了我国奶牛单产水平低,淘汰率高,制约了我国奶牛养殖效益的提高。运用微生物工程技术处理秸秆,提高粗饲料中的蛋白和碳水化合物含量,被认为是解决上述问题的有效方法。研究人员发现,利用纤维素分解菌及其复合菌制剂发酵秸秆,能够降低秸秆中的纤维素含量而提高蛋白质和碳水化合物含量^[1-3]。

国内关于纤维素分解细菌的研究报道较多,但菌种来源主要是林场、土壤、动物粪便、堆肥、废纸浆、温泉等^[4-8],而从反刍动物瘤胃液中分离纤维素分解细菌的报道较少^[9-12],特别是单独从奶牛瘤胃液中分离兼性厌氧细菌尚未见报道。由于青贮饲料或微贮饲料的发酵要经历耗氧期再进入厌氧发酵,因此兼性厌氧细菌作为青贮或微贮饲料微生物添加剂更具有优势。为此,本研究对奶牛瘤胃液中的兼性厌氧纤维素分解细菌进行了分离和鉴定,并对细菌的生长特性和致病性作了初步研究,以期对绿色粗饲料微生物添加剂的研究和开发提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂 羧甲基纤维素钠(CMC-Na),天津市巴斯夫化工有限公司产品;刚果红,天津市凯通化学试剂有限公司产品;细菌微量生化反应管,杭州天和微生物试剂有限公司产品;UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒,均为上海生工生物工程技术有限公司产品;pMD18-T Simple Vector,限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I, X-gal, IPTG, 核酸分子量标准,均为宝生物(大连)有限公司产品。引物合成及 16S rDNA 序列测定均由上海生工生物工程技术有限公司完

成。

1.1.2 培养基 (1)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基。用于纤维素分解菌的初筛。每升含 20 g CMC-Na, 2 g KH_2PO_4 , 1.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 g MgSO_4 , 0.3 g CaCl_2 , 痕量的 FeSO_4 、 MnSO_4 、 ZnCl_2 、 CoCl_2 , 1 g 半胱氨酸, 100 mL 无细胞瘤胃液, 20 g 琼脂粉, 制成羧甲基纤维素钠平板。

(2)加富羧甲基纤维素钠培养基。用于纤维素分解菌纯化、培养。每升含 20 g CMC-Na, 2.5 g Na_2HPO_4 , 1.5 g KH_2PO_4 , 2.5 g 蛋白胨, 0.5 g 酵母浸膏粉, 1 g 半胱氨酸, 100 mL 无细胞瘤胃液, 20 g 琼脂粉, 制成加富羧甲基纤维素钠平板。

(3)种子液。用于纤维素分解菌增菌。每升含蛋白胨 10 g, 酵母浸膏粉 10 g, 葡萄糖 10 g。

1.1.3 试验动物 18 只健康昆明小白鼠,购自山东米歇尔生物制品有限公司,体质量 18~22 g,均为雌鼠。

1.1.4 奶牛瘤胃液 采自山东泰安金兰养牛厂。选取 5 头干奶期健康黑白花奶牛,通过胃导管虹吸法采集瘤胃液。瘤胃液导出后快速无菌转移到厌氧袋中,低温保存,1 h 后分离、接种。从 2006-07—2006-12,前后共采样 5 次。

1.2 纤维素分解菌的分离与筛选

将采集的瘤胃液无菌涂布于羧甲基纤维素钠平板,置于 37 ℃ 严格厌氧条件下培养 24~48 h,挑取单菌落接种到加富羧甲基纤维素钠平板上进行纯化。纯化后的菌落在种子液中培养 36 h 后,加入未加去细胞瘤胃液的羧甲基纤维素钠平板上已经打好的孔(直径 $\varphi=3$ mm)中,37 ℃ 培养 48 h,然后用 1 g/L 刚果红染液染色 30 min,用 1 mol/L 氯化钠溶液冲洗后观察琼脂孔周围透明圈大小,筛选出透明圈直径 $\varphi \geq 7$ mm 的细菌。

1.3 纤维素分解菌的鉴定

1.3.1 形态学特征 接种纯化菌落于加富羧甲基纤维素钠平板上,培养 24~48 h,观察菌落特征。革兰氏染色法染色,镜检,对于阴、阳性不明显的菌株,采用 30 g/L KOH 破壁拉丝法,辅助判定细菌的阴、阳性。

1.3.2 生化鉴定 革兰氏阴性菌主要参照文献[13-15]的方法进行鉴定,纯化的单菌落分别接种 21

种生化管,24~48 h内观察生化管颜色变化,确定细菌的编码,然后按编码手册确定细菌的种属。革兰氏阳性菌主要参照文献[15-16]的方法进行鉴定,纯化的单菌落接种生化管,通过生化管颜色变化确定细菌的生化特性,进而确定细菌所在的属。

1.3.3 16S rDNA 基因序列分析法鉴定 对分解纤维素能力强的3株 G^+ 芽孢杆菌(9,15和22号),3株经生化鉴定为肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种、但有植生或土生克雷伯氏菌可能的、且鉴定编号不同的 G^- 细菌(2,30和50号),以及1株疑似产酸克雷伯氏菌的 G^- 细菌(29号,生化鉴定7位编码中最后一位不符),采用16S rDNA序列分析法进行鉴定。

(1)细菌基因组DNA的提取。细菌经纯化后,用UNIQ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒提取细菌基因组DNA,作为聚合酶链式反应(PCR反应)的模板。

(2)16S rDNA 基因序列的PCR扩增。设计1对通用引物:上游引物序列为5'-GAGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3',下游引物序列为5'-CTACGGCTACCTTGTTTCAGA-3';分别对应于大肠杆菌16S rDNA核苷酸保守序列上的7~27位和1495~1515位。PCR反应在25 μ L标准反应体系中进行,内含2.5 μ L 10 \times 扩增缓冲液(Mg^{2+} free),2 μ L $MgCl_2$ (25 mmol/L),2 μ L dNTP混合物(2.5 mmol/L),上、下游引物各1 μ L(25 pmol/ μ L),0.3 μ L *Taq* 酶(2.5 U/ μ L),1 μ L 模版DNA,加无菌双蒸水至25 μ L。扩增程序为:95 $^{\circ}C$ 预变性5 min;95 $^{\circ}C$ 30 s,53 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 1 min,循环30次;72 $^{\circ}C$ 延伸10 min。扩增产物在10 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳分离后,通过UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒纯化回收。

(3)16S rDNA 基因序列的克隆。将纯化的PCR产物4.5 μ L、pMD-T 18载体0.5 μ L、连接缓冲液5 μ L混合均匀后,16 $^{\circ}C$ 连接过夜,构建重组质粒。然后转化感受态*E. coli* JM109。将转化好的*E. coli* JM109菌液涂布于含氨苄青霉素(100 mg/L)、X-gal(40 mg/L)和IPTG(24 mg/L)的LB平板上,37 $^{\circ}C$ 培养12 h挑取白色单菌落,接入加有氨苄青霉素(100 mg/L)的LB培养基上进行单菌落扩大培养。

扩大培养后的菌液,通过UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒快速提取质粒DNA,进行*EcoR* I和*Pst* I双酶切。酶切体系为20 μ L,内含无菌水5 μ L,10 \times H缓冲液2 μ L,质粒DNA 8 μ L,*EcoR* I

2.5 μ L,*Pst* I 2.5 μ L。酶切后采用1 g/L琼脂糖电泳检测重组质粒,将含有阳性质粒的大肠杆菌菌液送交上海生工生物工程技术有限公司进行测序,测序过程采用通用测序引物,正反向加中间反应3个反应测通序列。

1.3.4 细菌系统发育树的构建 将测序结果通过Blastn程序与GenBank数据库中的已知序列进行比较,选取一致性高的不同菌株的序列,用ClustalX软件进行多序列比对,然后按Phylip格式输出。采用Phylip(3.67)软件,用bootstrap法生成1000个重复序列组,采用Neighbor-Joining生成众多发育树,最后用Consense程序检验和优选进化树。

1.4 纤维素分解菌生长特性测定

参照文献[15]的方法,测定细菌的生长温度和生长pH值。将纯化的细菌接种于种子液试管中,然后将试管分别置于4,20,30,37,41,45和65 $^{\circ}C$ 培养,48 h后观察细菌的生长状况,确定其适宜的生长温度。将纯化的细菌菌液分别涂布于pH为3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0和12.0的加富羧甲基纤维素钠平板上,培养48 h后观察细菌的生长状况,确定其适宜的生长pH值。

1.5 纤维素分解菌致病性测定

致病性试验选取2,9,15,22和29号5种有代表性的菌株。首先将细菌在含有5%(体积分数)绵羊血的营养琼脂平板上培养,观察有无溶血现象。然后将细菌在种子液中培养36 h后,腹腔接种质量20 g左右的昆明小白鼠。每种细菌设置0.1,0.2和0.4 mL/只3个剂量梯度,每个剂量接种1只小白鼠。对照组选3只小白鼠,分别接种无菌种子液0.1,0.2和0.4 mL/只。接种后1周内观察小白鼠的生长情况。

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌细菌的分离

从奶牛瘤胃液中共分离到63株纤维素分解细菌,其中 G^- 菌50株, G^+ 菌13株。严格厌氧条件下分离出的63株细菌,均可在有氧条件下生长,而且细菌的生长状况与厌氧条件下无明显差异,可判定这63株细菌均为兼性厌氧细菌。

2.2 纤维素分解菌的形态学特征

63株纤维素分解菌在加富羧甲基纤维素钠培养基上生长48 h后, G^- 细菌大多形成圆形隆起、边缘整齐、光滑湿润、半透明淡黄色菌落,直径1.5 mm左右;镜检为 G^- 短杆菌,两端钝圆,有的菌体有

荚膜。G⁺ 细菌大多形成圆形或梭形、扁平、边缘不整、无光泽的白色菌落,直径 2 mm 左右;镜检为 G⁺ 球杆菌,有的可见芽孢。

2.3 纤维素分解菌刚果红染色筛选

63 株纤维素分解菌通过刚果红染色,共筛选出

表 1 纤维素分解菌刚果红染色后的透明圈直径

Table 1 Diameter of clear haloes around cellulolytic bacteria dyed by Congo red

菌株编号 Strain No.	1	2	3	9	15	17	19	21	22	23	28	29	30	39	50
透明圈直径/mm Diameter of clear haloes	13	10	13	19	23	11	21	23	13	13	10	19	19	10	11

2.4 纤维素分解菌的鉴定

2.4.1 生化试验结果 通过生化试验,分离到的 63 株细菌中有 34 株可鉴定到属或属以下水平(表 2)。24 株分解纤维素能力强的 G⁻ 菌中,有 23 株鉴定到种或亚种,另外 1 株疑似产酸克雷伯氏菌(生化

29 株透明圈直径 $\varphi \geq 7$ mm 的细菌,其中 24 株为 G⁻ 菌,5 株为 G⁺ 菌。表 1 列出了 15 株透明圈直径 $\varphi \geq 10$ mm 的细菌,其余 14 株细菌的透明圈直径为 7~9 mm。

鉴定 7 位编码中最后一位不符)。18 株肺炎克雷伯氏菌的生化试验结果编码并不完全相同,对应了 3 个不同的编码,同时存在植生克雷伯氏菌和土生克雷伯氏菌的可能性。5 株分解纤维素能力强的 G⁺ 菌均为芽孢杆菌,只能鉴定到属。

表 2 纤维素分解菌的生化试验鉴定结果

Table 2 Biochemical characterization of cellulolytic bacteria

细菌类别 Type of bacteria species	细菌名称 Bacteria species	细菌株数 Number of bacteria
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种 <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	18
	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	2
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> bacterium	8
	棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	2
	微球菌属 <i>Micrococcus</i> Cohn	1

2.4.2 16S rDNA 序列分析 图 1 结果表明,纤维素分解细菌的 16S rDNA 序列长度约 1 500 bp。通过 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定,结果显示重组质粒 PMD18-T-16S rDNA 被切成 700 和 800 bp 2 段(图

2),测序结果却显示插入片断为正常的 16S rDNA 序列,这可能是由于 16S rDNA 序列上存在 *EcoR* I 或 *Pst* I 酶切位点所致。

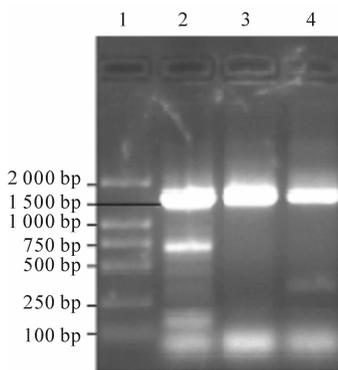


图 1 纤维素分解菌 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增产物

1. DNA 标准 DL-2000;2~4. 16S rDNA 序列产物

Fig. 1 PCR product of cellulolytic bacteria

16S rDNA gene sequence

1. Maker DL-2000;2-4. Product of 16S rDNA gene

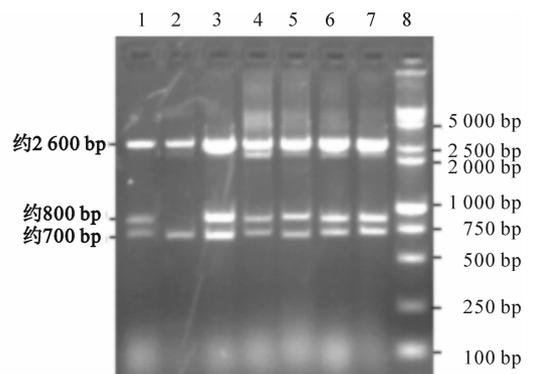


图 2 重组质粒 pMD18-T-16S rDNA 的双酶切鉴定

1~7. 重组质粒 pMD18-T-16S rDNA 的双酶切产物;

8. DNA 标准 DL-15000+2000

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

pMD18-T-16S rDNA digested by *EcoR* I and *Pst* I

1-7. Products of recombinant plasmid pMD18-T-16S

rDNA digested by *EcoR* I and *Pst* I; 8. DNA Maker DL-15000+2000

细菌分类学家普遍认为,若 2 个物种的 16S rD-

NA 序列同源性大于 97%,可认为是属内的同一个

种。9 号细菌的 16S rDNA 序列经 MegAlign 软件进行同源性分析发现,其与几种已知细菌有相同的、最高的同源性。15 号细菌也存在这种情况。因此,借助 Phylip 软件绘制系统发育树来辅助判定细菌的种属。根据 Phylip 软件绘制的系统发育树(图 3, 4, 5)和 MegAlign 软件同源性分析结果可以认为,9 号细菌为苏云金芽孢杆菌,15 号细菌为巨大芽孢杆菌,29 号细菌为产酸克雷伯氏菌。其中 9 号细菌与苏云金芽孢杆菌有 99.7%的同源性,15 号细菌与巨大芽孢杆菌有 99.6%的同源性,29 号细菌与产酸克雷伯氏菌有 99.8%的同源性。

2,30 和 50 号细菌经 16S rDNA 序列分析,均为肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种,排除了植生克雷伯氏菌和土生肺炎克雷伯氏菌的可能。其中 2 号与肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种有 99.7%的同源性。2,30 和 50 号细菌在同一个发育树中的位置如图 6 所示。2 号与 30 和 50 号的序列同源性分别为 99.3%和 98.9%,显示出其序列存在一定的差异,与生化试验结果的不同编码一样,可能代表了株的特异性。

22 号细菌经 16S rDNA 序列分析,其序列与蜡状芽孢杆菌有 99.5%的同源性,可归为蜡状芽孢杆菌。

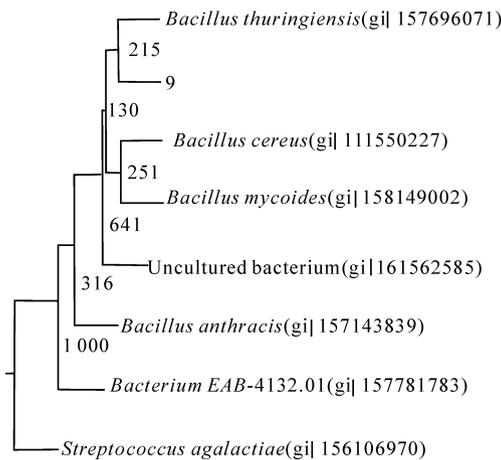


图 3 9 号纤维素分解菌 16S rDNA 全序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of cellulolytic bacterium No. 9 based on 16S rDNA full-length sequence

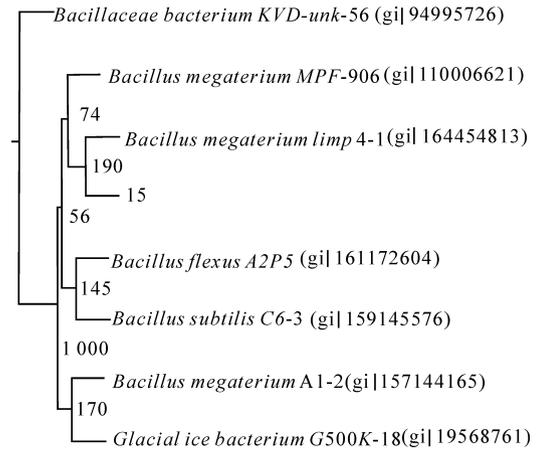


图 4 15 号纤维素分解菌 16S rDNA 全序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of cellulolytic bacterium No. 15 based on 16S rDNA full-length sequence

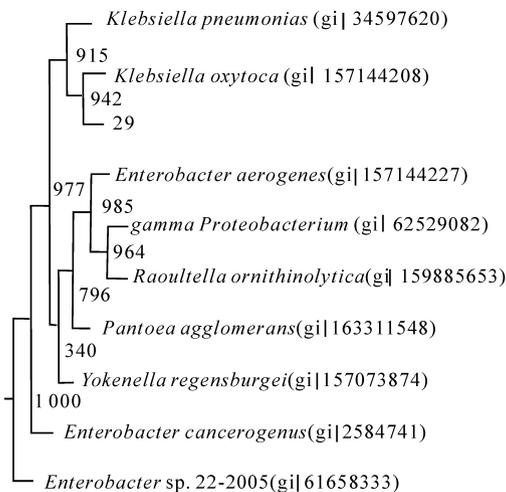


图 5 29 号纤维素分解菌 16S rDNA 全序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of cellulolytic bacterium No. 29 based on 16S rDNA full-length sequence

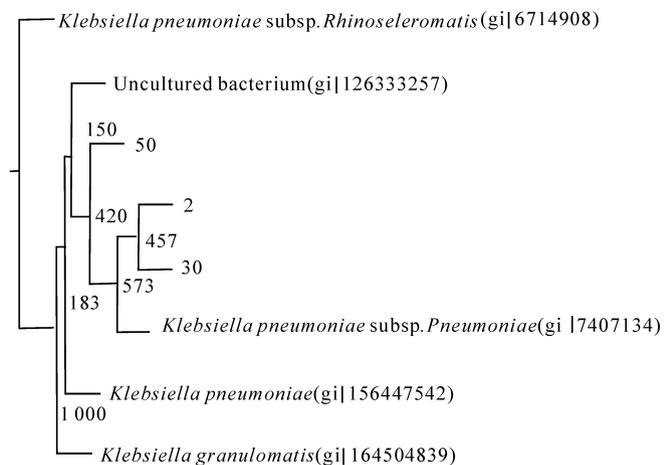


图 6 2,30 和 50 号纤维素分解菌 16S rDNA 全序列的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of cellulolytic bacteria No. 2, No. 30 and No. 50 based on 16S rDNA full-length sequence

2.5 纤维素分解菌的生长特性

纤维素分解菌在加富羧甲基纤维素钠平板上长成菌苔,在 20~41 ℃ 生长良好,4 ℃ 可以生长,45 ℃ 生长差,65 ℃ 基本不生长。细菌在 pH 5.0~9.0 时生长良好,在 pH 4.0 和 10.0 时生长较差,在 pH 3.0,11.0,12.0 时基本不生长。

2.6 纤维素分解菌的致病性

纤维素分解菌在营养琼脂血平板上生长时,2,9,15 和 29 号均无溶血现象,22 号能够溶血,形成清晰的透明圈。

小鼠接种试验结果显示,2,9,15 号在 3 个剂量梯度接种量 1 周内均未引起小鼠死亡,小鼠精神状况良好。22 号在 3 个剂量梯度的接种量均导致小鼠在 1 d 后死亡。29 号 0.1 和 0.2 mL 菌液接种量 1 周内未引起小鼠死亡,小鼠精神状况良好;0.4 mL 菌液接种量导致小鼠精神沉郁,3 d 后死亡;重复试验表明,29 号 0.4 mL 菌液接种 5 只小鼠,结果 1 周内 1 只死亡,4 只生长良好。

致病性试验结果表明,2 号(肺炎克雷伯氏菌)、9 号(苏云金芽孢杆菌)和 15 号(巨大芽孢杆菌)无致病性,22 号(蜡状芽孢杆菌)具有致病性,29 号(产酸克雷伯氏菌)可能具有致病性。

3 结论与讨论

3.1 纤维素分解细菌的筛选

瘤胃微生物中对纤维素降解起主要作用的是瘤胃细菌和瘤胃真菌,原虫对纤维素也有一定的吞噬和降解作用^[17-19]。瘤胃真菌分泌的纤维素酶活性在所有瘤胃微生物中最高,但是真菌生长过程中能产生大量的孢子,导致饲料的适口性差,因此不宜作为粗饲料微生物添加剂^[20]。瘤胃中内毛目的某些原虫能吞噬和消化纤维素,并利用其降解产物合成胞内多糖^[21],但原虫的分离、培养程序繁琐,条件苛刻,有关其对纤维素分解的研究也比较少。瘤胃细菌因其在瘤胃微生物中数量最多,是瘤胃中分解纤维素的主要微生物,而且细菌的分离鉴定体系又比较完善,因此对于瘤胃细菌研究最多。

白色瘤胃球菌、生黄瘤胃球菌、溶纤维丁酸弧菌和产琥珀酸拟杆菌,被认为是瘤胃中主要的纤维素分解菌,均为严格厌氧菌,需要在严格厌氧和低氧化还原电位下才能生长,获得其纯培养很难^[22-23]。本试验起初以上述 4 种严格厌氧细菌为主要目标菌,采集和分离过程最大程度确保无氧环境,但最终未能获得这 4 种菌的纯培养。

本试验分离出的纤维素分解菌,均为兼性厌氧菌。细菌在 20~41 ℃、pH 5.0~9.0 条件下生长良好,在 pH 4.0 环境中也能生长。筛选到的肺炎克雷伯氏菌、苏云金芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌无致病性,能较好地分解纤维素,兼性厌氧生长特性能够适应青贮和微贮过程中初期有氧、中后期无氧的环境。

3.2 粗饲料微生物添加剂

在青贮饲料中,添加的乳酸菌能够利用饲料中的水溶性碳水化合物产生乳酸,使饲料的 pH 值急剧下降,从而抑制腐败梭菌或其他有害菌的繁殖,起到防腐保鲜的作用。但是乳酸菌不具备分解纤维素和水解蛋白质的酶系,饲料中的纤维素、木质素及蛋白质没有被分解,对饲料的营养价值提高有一定影响^[20]。适当添加一些分解纤维素的微生物,可以提高青贮饲料的营养价值。

本试验分离出的 G⁺ 细菌主要是芽孢杆菌,有关芽孢杆菌分解纤维素的报道较多^[4-5,8-9],国家规定的可以作为饲料添加剂的微生物菌种中也包括芽孢杆菌。但苏云金芽孢杆菌作为微生物杀虫剂的研究很多^[24],有关分解纤维素的研究却很少;对巨大芽孢杆菌有固氮及产淀粉酶方面的研究^[25-27],却未有分解纤维素的研究;刚果红染色筛选表明,这 2 株菌能够较好地分解纤维素,而且 2 株细菌无致病性,有作为粗饲料添加剂的可能。

本试验分离出的 G⁻ 细菌主要是肺炎克雷伯氏菌,克雷伯氏菌有固氮和分解纤维素的功能^[28],并且肺炎克雷伯氏菌可用于分解纤维素制取 1,3-丙二醇^[29-30]。虽然肺炎克雷伯氏菌是一种条件性致病菌,有引起牛猝死的报道^[31],但本试验被采样奶牛在采样期间没有出现肺炎克雷伯氏菌感染症状,在做小鼠致病性试验时该菌也未引起小鼠死亡。可以设想,肺炎克雷伯氏菌在不引起机体发病的情况下,可能在机体利用纤维素方面起有益作用,但能否作为粗饲料微生物添加剂,是否可以适量添加,还有待进一步研究。

3.3 细菌的鉴定

细菌鉴定过程中采用了生化试验和 16S rDNA 序列分析方法。对于 G⁻ 细菌的生化鉴定,可依据的权威鉴定手册较多,能够较好地对某些细菌作出鉴定。本试验中,肺炎克雷伯氏菌通过生化试验可以直接鉴定到亚种水平。对于 G⁺ 细菌的生化鉴定,尚无权威的鉴定手册可供参照,本试验参考了文献^[16],只能鉴定到属的水平。

16S rDNA 碱基测序对微生物分类是一项十分

重要的分子生物学手段。本试验对 16S rDNA 进行同源性分析发现,待鉴定细菌与多株已知细菌的同源性都在 97% 以上。通过构建 16S rDNA 序列系统发育树,可辅助判定细菌的种属。系统发育树的节点处标有 Bootstrap 值,15 号细菌的 Bootstrap 值比较低,结构不稳定;而 29 号细菌的 Bootstrap 值比较高,是较好的树。

生化试验操作简单,速度快,花费低,但试验的可重复性差,鉴定率低。16S rDNA 序列分析方法与生化鉴定相比,鉴定细菌的准确性更高。

[参考文献]

- [1] 孟庆翔,肖训军,俞宏,等.微生物处理小麦秸作为生长肥育牛饲料的营养价值[J].中国畜牧杂志,1999(6):3-5.
Meng Q X, Xiao X J, Yu H, et al. Treatment of wheat straw with microorganisms and nutritive values of the treated straw as feeds for growing beef cattle [J]. Chinese Journal of Animal Science, 1999(6):3-5. (in Chinese)
- [2] 潘锋. 秸秆微生物共发酵生产单细胞蛋白研究[D]. 南京:南京理工大学,2002.
Pan F. Study on co-fermentation straw with microorganism to produce single cell protein [D]. Nanjing: Nanjing University Science and Technology, 2002. (in Chinese)
- [3] 李日强,张峰,韩文辉,等.不同菌株固态发酵废白酒糟生产饲料蛋白的研究[J].重庆环境科学,2003,25(11):63-64,86.
Li R Q, Zhang F, Han W H, et al. Study on the solid-state fermentation of distillers' grains to produce feeding-protein by using some fungal strains [J]. Chongqing Environmental Science, 2003, 25(11):63-64, 86. (in Chinese)
- [4] 史玉英,沈其荣,娄无忌,等.纤维素分解菌群的分离和筛选[J].南京农业大学学报,1996,19(3):59-62.
Shi Y Y, Shen Q R, Lou W J, et al. Isolation and screening of Cellulose-decompose mixing strains [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1996, 19(3):59-62. (in Chinese)
- [5] 孟会生,刘卫星,洪坚平.纤维素分解菌群的筛选组建与羧甲基纤维素酶活初探[J].山西农业大学学报,2006,26(1):27-28, 31.
Meng H S, Liu W X, Hong J P. Research on screening of Cellulose-decomposing strains and activity of CMCNase [J]. J Shanxi Agric Univ, 2006, 26(1):27-28, 31. (in Chinese)
- [6] 张辉,杨启银,戴传超,等.牛粪堆肥中好氧纤维素降解菌群及产酶条件研究[J].江苏农业科学,2004(6):146-150.
Zhang H, Yang Q Y, Dai C C, et al. The study of aerobic cellulose-decompose mixing strains and its cellulolytic enzymes production in ox dung composting [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2004(6):146-150. (in Chinese)
- [7] 蔡兴旺,路福平,杜连祥.兼性厌氧纤维素降解菌的筛选和产酶研究[J].工业微生物,2005,35(1):6-9.
Cai X W, Lu F P, Du L X. Screening for combined-anaerobic hyper cellulolytic fungi and its cellulolytic enzymes production [J]. Industrial Microbiology, 2005, 35(1):6-9. (in Chinese)
- [8] 沈雪亮,夏黎明.产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J].林产化学与工业,2002,22(1):47-51.
Shen X L, Xia L M. Studies on screening of cellulose producing bacteria and enzymatic characteristics thereof [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2002, 22(1):47-51. (in Chinese)
- [9] 郭爱莲,阮翔.产纤维素酶细菌××-01的研究[J].西北林学院学报,1997,12(2):46-51.
Guo A L, Ruan X. Studies on the bacteria ××-01 of the Cellulase [J]. Journal of Northwest Forestry College, 1997, 12(2):46-51. (in Chinese)
- [10] 郭爱莲,刘梅,王宏仓,等.产纤维素酶细菌的选育研究[J].西北轻工业学院学报,1997,15(1):46-50.
Guo A L, Liu M, Wang H C, et al. Studies on the screening of cellulose producing bacteria [J]. Journal of Northwest Institute of Light Industry, 1997, 15(1):46-50. (in Chinese)
- [11] 朱玉玺.纤维素优良降解菌的筛选分离及其特性研究[D].西安:西安建筑科技大学,2005.
Zhu Y X. The separation and the studying of the Cellulose-degrading preponderant strains [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2005. (in Chinese)
- [12] 荣华,邱成书,胡国全,等.一株大熊猫肠道厌氧纤维素菌的分离鉴定、系统发育分析及生物学特性的研究[J].应用与环境生物学报,2006,12(2):239-242.
Rong H, Qiu C S, Hu G Q, et al. Isolation of cellulolytic anaerobic strain from giant Panda's intestines and its biological characteristics and phylogen [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2006, 12(2):239-242. (in Chinese)
- [13] 蔡妙英,徐迪诚,马俊才.革兰氏阴性杆菌编码鉴定手册[M].黑龙江:黑龙江科学技术出版社,1998:18-19.
Cai M Y, Xu D C, Ma J C. Numerical identification manual for gram-negative bacteria [M]. Heilongjiang: Heilongjiang Science and Technology Press, 1998:18-19. (in Chinese)
- [14] 徐迪诚,蔡妙英.革兰氏阴性杆菌新编码鉴定手册[M].黑龙江:黑龙江科学技术出版社,1994:18-20.
Xu D C, Cai M Y. New numerical identification manual for gram-negative bacteria [M]. Heilongjiang: Heilongjiang Science and Technology Press, 1994:18-20. (in Chinese)
- [15] 东秀珠.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:364.
Dong X Z. Common manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001:364. (in Chinese)
- [16] 廖文,何颖,高海燕,等.临床常见革兰阳性菌属简易鉴定法的研究[J].中国公共卫生,2003(7):874-875.
Liao W, He Y, Gao H Y, et al. The study of facility identification method of common Gram-positive bacterium in clinic [J]. Chinese Journal of Public Health, 2003(7):874-875. (in Chinese)
- [17] Akin D E, Rigsby L L. Degradation of bermuda and orchard grass by species of ruminal bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50(4):825-830.

- [18] Mohammed N, Onodera R, Or-Rashid M M. Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture *in vitro* [J]. *Amino Acids*, 2003, 24(1/2): 73-80.
- [19] Zhang Y, Gao W, Meng Q. Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fibre particle size [J]. *Arch Anim Nutr*, 2007, 61(2): 114-125.
- [20] 陈洪章. 纤维素生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 82-92.
Chen H Z. Cellulolytic biotechnology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 82-92. (in Chinese)
- [21] Coleman G S. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by *Entodinium* species, *Eudiplodinium maggii*, some other entodiniomorphid protozoa and natural protozoal populations taken from the ovine rumen [J]. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73(6): 507-513.
- [22] Hungate R E. Symposium on microbiology of the rumen [J]. *Bacteriol Rev*, 1955, 19(4): 277-279.
- [23] 布瑞德. 伯吉氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
Breed. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 8 edition. Beijing: Science Press, 1984. (in Chinese)
- [24] 关 雄. 苏云金芽孢杆菌研究回顾与展望 [J]. *中国农业科技导报*, 2006, 8(6): 5-11.
Guan X. Progress in the studies and application of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2006, 8(6): 5-11. (in Chinese)
- [25] 龙 苏, 李法峰, 陈 明, 等. 固氮球形芽孢杆菌与巨大芽孢杆菌的混合增效作用 [J]. *核农学报*, 2000, 14(6): 337-341.
Long S, Li F F, Chen M, et al. The enhanced effect of co-culture on nitrogen fixing activity of *B. sphaerium* and *B. megaterium* [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2000, 14(6): 337-341. (in Chinese)
- [26] 刘旭明. 固氮芽孢杆菌的分离鉴定以及固氮巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) C4 在玉米、水稻、小麦上的定殖研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Liu X M. Isolation and identification of Nitrogen-fixing *Bacillus* and colonization of maize, rice and wheat by Nitrogen-fixing *Bacillus megaterium* C4 [D]. Beijing: China Agriculture University, 2005. (in Chinese)
- [27] 吕向阳, 蒋如璋, 王桂芬. 巨大芽孢杆菌淀粉酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的表达 [J]. *遗传学报*, 1991, 18(2): 185-192.
Lü X Y, Jiang R Z, Wang G F. Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus megaterium* and its expression in *Bacillus subtilis* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1991, 18(2): 185-192. (in Chinese)
- [28] 蔡燕飞, 李华兴, 彭桂香, 等. 纤维素分解菌的筛选及鉴定 [J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(2): 67-70.
Cai Y F, Li H X, Peng G X, et al. Isolation and identification of cellulose-decomposing mixed strain [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2005, 25(2): 67-70. (in Chinese)
- [29] Huang H, Gong C S, Tsao G T. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 98(100): 687-698.
- [30] Cheng K K, Liu D H, Sun Y, et al. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(11): 911-915.
- [31] 周玉龙, 李国军, 李 阳, 等. 奶牛肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定 [J]. *中国奶牛*, 2007(6): 36-37.
Zhou Y L, Li G J, Li Y, et al. Isolation and characterization of dairy cow *Klebsiella pneumoniae* [J]. *China Dairy Cow*, 2007(6): 36-37. (in Chinese)

(上接第 34 页)

- [16] 李雨林, 周海英, 申 琳, 等. 无花果蛋白酶与木瓜蛋白酶对牛肉嫩化的研究 [J]. *肉类工业*, 2006(11): 31-33.
Li Y L, Zhou H Y, Shen L, et al. Investigation on beef-tenderizing by ficin and papain [J]. *Meat Industry*, 2006(11): 31-33. (in Chinese)
- [17] Culler R D, Parrish F C, Smith G C. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle [J]. *Journal Food Science*, 1985, 50: 1370.
- [18] Locker R H. Degree of muscle contraction as a factor in the tenderness of beef [J]. *Food Research*, 1960, 25: 304-307.
- [19] Koohmaraie M, Kent M P, Shackelford S D, et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? [J]. *Meat Science*, 2002, 62: 345-352.
- [20] Ahnström M L, Enfält A C, Hansson I, et al. Pelvic suspension improves quality characteristics in *M. semimembranosus* from Swedish dual purpose young bulls [J]. *Meat Science*, 2006, 72: 555-559.
- [21] White A, O'Sullivan A, Troy D J, et al. Effects of electrical stimulation, chilling temperature and hot-boning on the tenderness of bovine muscles [J]. *Meat Science*, 2006, 73: 196-203.