

苜蓿青贮用乳酸菌复合系 A12 的组成多样性

王小芬,高丽娟,杨洪岩,王伟东,崔宗均*

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094)

摘 要 苜蓿是高蛋白的饲料作物,青贮是保存青草过冬的主要手段,但苜蓿是难青贮的作物,添加乳酸菌制剂是解决苜蓿青贮难的有效措施。本研究室通过连续的限制性培养筛选到苜蓿青贮用乳酸菌复合系 A12,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、平板分离及建立 16S rDNA 克隆文库 3 种手段相结合分析 A12 的组成多样性,确认 A12 复合菌系由 7 株菌组成,全部属于 *Lactobacillus*。其中 3 株菌 A12-1i, A12-2i, A12-3i 通过平板分离得到,分别属于 *L. plantarum* (99.9%)、*L. kimchii* (99.4%)、*L. farciminis* (100%)。在 A12 复合菌系的 16S rDNA 克隆文库中,上述 7 种菌的组成比例分别为 55.21%、19.79%、14.58%、3.13%、3.13%、3.13%、1.03%。

关键词 :乳酸菌 ;复合菌系 ;DGGE ;16S rDNA ;克隆文库 ;多样性

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209 (2006) 05-0767-06

苜蓿是一种高蛋白的饲料作物,被称作“牧草之王”。青贮是保存饲料营养价值的有效手段,但苜蓿由于蛋白含量高、可溶性碳水化合物和干物质含量低,并且因为茎组织中空,有大量空气存在,难以在青贮窖中形成厌氧环境,是难青贮的材料^[1]。接种乳酸菌制剂被认为是具有安全、对环境无污染、对农机具无腐蚀、价格低廉等优点的好方法^[2]。

接种乳酸菌可使乳酸菌迅猛繁殖,产生大量乳酸,使 pH 迅速降低,增加乳酸/乙酸^[3~5]。但向青贮材料中接种纯培养微生物常常得不到希望的效果^[1,4,5]。本研究室通过连续的限制性培养,从苜蓿青贮料中筛选到一组含有多株乳酸菌的苜蓿青贮用乳酸菌复合系 A12,该菌系在玉米粉培养基、苜蓿汁培养基和 MRS 培养基中将 pH 稳定到 3.8~4.0 需 10h、16h 和 20h,并发出香甜气味。用气质联机分析其发酵液结果,检测出较高的乙酸、乳酸,还有少量甲酸、丙酸等挥发性脂肪酸及丁二醇、乙酸乙酯、异丁醛、乙醛、乙酰胺等风味物质;在代谢产物中乙酸和乳酸占总代谢物的 98% 以上^[6]。

平板分离是常用的分离微生物的手段,但它无法分离难培养的微生物或目前还不能培养的微生物。逐渐发展起来的分子生物学手段,避免了经典微生物技术在多样性研究中的局限性,它们与传统的分离培养方法可以相互补充相互比较。由于 16S rDNA 序列的保守性和存在的普遍性,以及核酸

序列本身的稳定性,序列分析的重现性极高,应用 16S rDNA 作为分子指标,可以实现快速、微量、准确、简便地对微生物进行分类鉴定^[7]。本研究的思路是通过结合平板分离、变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)及建立菌群 16S rDNA 克隆文库,以 DGGE 作为筛选手段,根据克隆子 16S rDNA 可变区 V₃ 区的 PCR 产物在胶中迁移位置的不同筛选出目的克隆^[8],然后将目的克隆插入的 16S rDNA 全长测序。并且以 DGGE 作为研究手段监测菌群各代的变化及随时间变化菌群的变迁。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 苜蓿青贮用乳酸菌复合系 A12 为本实验室筛选。参考菌株为本试验在复合系中分离的单菌 A12-1i, A12-2i, A12-3i 和通过建立 A12 复合系的克隆文库得到的 7 个克隆 A12-4c, A12-5c... A12-10c。在 GenBank 的登录号依次为 DQ056419, DQ056420, DQ056421, DQ056422, DQ056423, DQ056424, DQ056425, DQ056426, DQ056427, DQ056428。

1.1.2 试剂和仪器 Toyobo 公司生产的 RNA 酶; Perkin Elmer 生产的 Ampli Taq Gold ;Qiagen 公司生产的 QIAEX II gel extraction kit ;Promega 公司生产的 pGEM[®] -T Easy ;Molecular Probes 生产的 SYBR GREEN

* 通讯作者。Tel 86-10-62733437 ;E-mail :acuizj@cau.edu.cn

作者简介 王小芬(1976-),女,山西临汾人,讲师,主要从事生物质资源利用及微生物群体功能研究。E-mail :wxiaofen_16@yahoo.com.cn

其他作者 吕育财

收稿日期 2005-11-24 接受日期 2006-01-16 修回日期 2006-04-03

1 Perkin Elmer 生产的 BigDye Kito 日本 HORIBA 公司产 B-212 型 Compact pH meter ;日本岛津公司产 QP-5050 型气质联用机 (GC-MS) ;美国 Bio-Rad 公司生产的 DCode 突变检测系统 ;ABI 377 DNA 测序仪。

1.2 微生物的培养分离

MRS 培养基(蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母提取物 5g, K_2HPO_4 2g,柠檬酸二铵 2g,乙酸钠 5g,葡萄糖 20g,吐温 80 1mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g, pH 调至 6.2~6.4,115℃灭菌 20min)加 15g/L 琼脂做固体平板,培养物按 10 倍梯度制作稀释液涂布平板培养基后,装入塑料袋,充氮气 3min 后密封,30℃培养。等菌落长出后,根据菌落形态移至新鲜的平板培养基,划线纯化,尽可能多取一些菌落,纯化 3 次后,用灭菌的牙签挑取少量的单菌落,作为 PCR 的模板,用 DGGE 辅助筛选不同的菌株。

1.3 pH 及代谢产物的测定

用 Compact pH meter 测定 pH。代谢产物过 0.22 μ m 微孔过滤器后使用气质联用机测定。测定条件:分析柱:CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱(25m $\times$ 0.25mm);柱箱温度:60℃(2 min) $\rightarrow$ 100℃,5℃/min, $\rightarrow$ 190℃(2min),15℃/min,共 18min;进样口温度:180℃;监测器温度 230℃;监测器电压 1.5kV;载气:氦气(50kPa);流量:30mL/min;进样器:进样量 1 μ L,分流比:1/20。对测定的数据,利用 NIST 数据库进行定性分析。又根据出峰物的定性分析结果,配制相应标准样品的稀释液作为标准物进样,用于该物质的定量分析。

1.4 DNA 提取

把 A12 在 MRS 培养液中混合培养后,8000r/min 离心 15min,弃上清收集菌体细胞,用氯仿-苯酚抽提法^[9]提取总 DNA。该方法提取时要加入 0.1g 直径 0.1mm 的锆珠破碎细胞壁,后用酚和氯仿/异戊醇去除蛋白,用异丙醇沉淀,用 RNA 酶去 RNA,用 2 $\times$ PEG 精制 DNA。

1.5 16S rDNA 的 PCR

1.5.1 分离单菌 16S rDNA 全长的 PCR:以 A12 的分离单菌 DNA 做模板,PCR 扩增 16S rDNA 全长。引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(对应大肠杆菌 *E. coli* 的 8~27 位)和 1492R:5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'(对应大肠杆菌 *E. coli* 的 1492~1510 位);反应体系为(50 μ L):10 $\times$ PCR Gold Buffer 5 μ L,25mmol/L $MgCl_2$ 4 μ L,2mmol/L dNTP mix 5 μ L,45pmol 27F 和 1510R 各 0.5 μ L,5U/ μ L Ampli Taq Gold 0.2 μ L,模板 DNA 5ng;反应程序为 95℃

10min,93℃变性 1min,50℃退火 1min,72℃延伸 1min 30s,共 25 个循环;最后引物延伸 5min。扩增产物以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 16S rDNA V_3 区域的 PCR:用于 DGGE 分析的 PCR 产物扩增区域是 16S rDNA 的可变区 V_3 区域。以不同培养时间或不同代的 A12 总 DNA 为模板,引物 357F-GC 序列为,GC clamp^b-5'-CCTACGGGAGGCA GCAG-3'(其中 GC-clamp 序列为 5'-CGCCGCGCGC GCGCGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGG-3');引物 517R 的序列为 5'-GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG-3'^[10]。PCR 反应体系为(50 μ L):10 $\times$ PCR Gold Buffer 5 μ L,25mmol/L $MgCl_2$ 4 μ L,2mmol/L dNTP mix 5 μ L,45pmol 357F 和 517R 各 0.5 μ L,5U/ μ L Ampli Taq Gold 0.2 μ L,模板 DNA 10ng。反应程序为 95℃ 10min,93℃变性 1min,48℃退火 1min,72℃延伸 1min10s,共 30 个循环,最后引物延伸 5min。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

用 DGGE 来筛选目的克隆和分离单菌的 16S rDNA V_3 区域的 PCR,以单菌落作为模板直接 PCR,反应体系及检测方法同上。

1.6 DGGE 分析

采用 DCode 突变检测系统(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, Calif)对 16S rDNA V_3 区域的 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。对于克隆文库和分离单菌的 16S rDNA V_3 区 PCR 产物的筛选,采用单梯度法,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (W/V),尿素与甲酰胺变性梯度为 0%~80% (尿素为 7mol/L,甲酰胺为 40% 时的变性浓度为 100%),在 61℃恒温下,200V 电泳 3h,采用 SYBR GREEN I 染色 30min,紫外凝胶成像系统分析结果^[11]。对于复合系 A12 总 DNA 的 PCR 扩增产物采用双梯度法^[12],聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%~12% (W/V),尿素与甲酰胺变性梯度为 20%~50%,在 61℃恒温下,200V 电泳 5h,染色与观察同上。

1.7 16S rDNA 克隆文库的构建及目的克隆的筛选

将 A12 菌复合系的总 DNA 作为模板进行 16S rDNA 全长 PCR,反应体系及检测方法见本文 1.5.1 所述。将扩增产物进行琼脂糖电泳,在紫外灯下切下胶上的扩增片段,用 QIAEX II gel extraction kit 纯化精制;纯化后的 DNA 与 pGEM[®]-T Easy 载体连接,16℃过夜,然后通过 42℃ heat shock 45s 转化到 *E. coli* JM109 菌体,通过 X-gal 和 IPTG 的 α -互补作用筛选出白色菌落。将白色菌落转移到新鲜的

含有抗生素的 LB 固体培养基上编号,同时沾取少量菌落作为模板扩增 V_3 区域,将扩增产物进行 DGGE,按照条带在 DGGE 胶上的位置,筛选出所有不同种类的克隆。

对含有目的克隆的菌体,用 SDS 碱裂解法提取质粒^[13],供测序。

1.8 16S rDNA 的测序及分析

对于克隆菌体提取的质粒及分离单菌的 16S rDNA,经 BigDye Kit 荧光染色后,使用 ABI 377 DNA 测序仪测序,测序过程按 ABI 公司操作说明书进行。

根据 16S rDNA 序列,查询互联网数据库 BLAST (DDBJ nucleotide sequence database)进行检索,分析亲缘关系及相似性。A12 菌系各菌在 GenBank 中的登录号分别为:DQ056419, DQ056420, DQ056421, DQ056422, DQ056423, DQ056424, DQ056425, DQ056426, DQ056427, DQ056428。

2 结果和分析

2.1 平板分离结果

通过稀释平板法在 MRS 培养基上获得菌落形状略微不同的 13 个菌落,经 DGGE 筛选,发现胶上有 3 种不同迁移位置类型的条带(图略),将 3 个代表条带菌株 A12-1i, A12-2i, A12-3i(在 DGGE 图谱上分别表示为 11, 12, 13),分别提取 DNA,扩增其 16S rDNA 全长,序列测定后,进行数据库检索,结果相似率最高的近缘种分别为:*Lactobacillus plantarum* (99.9%)、*Lactobacillus kimchii* (99.4%)、*Lactobacillus farciminis* (100%)。它们的 V_3 区的 PCR 产物在 DGGE 图谱上出现的位置如图 1 泳道 2、3、4 所示。此 3 株菌经革兰氏染色结果均为革兰氏阳性菌,镜检结果均为杆状,均无芽孢,不运动。3 种分离单菌在 MRS 培养基中降低 pH 和产乳酸的动态变化见图 2,3 种单菌在 MRS 培养基上能够迅速降低培养基的 pH,并且产生大量乳酸。pH 从接种开始至 24h 迅速下降,同时这个阶段也是乳酸大量生成的阶段,说明在这个阶段,乳酸菌大量繁殖,将培养基中的可溶性碳水化合物迅速转变为乳酸,从而引起 pH 的降低。由图可见, A12-1i 的降低 pH 和产乳酸的能力最强, A12-2i 其次, A12-3i 最弱。

2.2 DGGE 结果

将 A12 在 MRS 培养基中培养 48h 后收集细胞,提取总 DNA 后,进行 16S rDNA V_3 区域的 PCR,最后将 PCR 产物进行 DGGE,结果出现明显的两条带

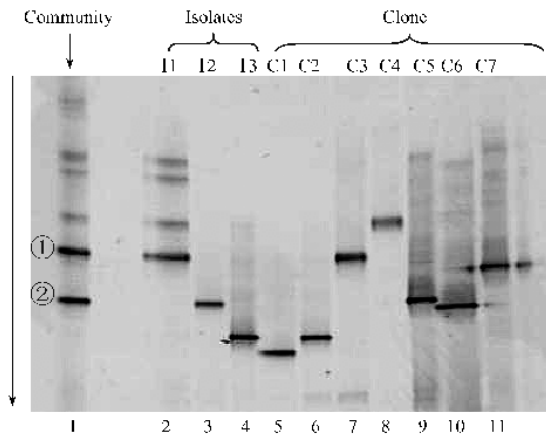


图 1 A12 复合菌系组成多样性的变性梯度凝胶电泳图谱 Fig.1 DGGE patterns of composition of A12 community. Lane1 is A12 community; Band ① is *Lactobacillus plantarum*, Band ② is *Lactobacillus kimchii*; Lane2, *Lactobacillus plantarum* A12-1i; Lane 3, *Lactobacillus kimchii* A12-2i; Lane 4, *Lactobacillus farciminis* A12-3i; Lane 5, *Lactobacillus farciminis* A12-1c; Lane 6, *Lactobacillus farciminis* A12-2c; Lane 7, *Lactobacillus plantarum* A12-3c; Lane 8, *Lactobacillus pentosus* A12-4c; Lane 9, *Lactobacillus kimchii* A12-5c; Lane 10, *Lactobacillus kimchii* A12-6c; Lane 11, *Lactobacillus pentosus* A12-7c.

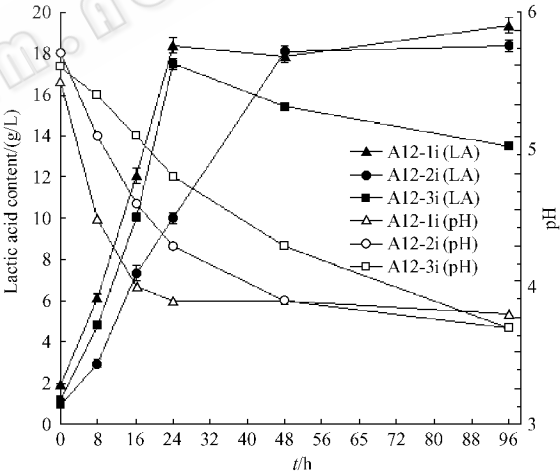


图 2 A12 的单菌在 MRS 培养基中 pH 及乳酸动态变化 Fig.2 The dynamic changes in pH and lactic acid production of the isolates from A12 community cultivated in MRS media.

①和②(图 2 泳道 1),分别对应分离单菌 A12-1i 和 A12-2i(泳道 2 和 3)的条带,在泳道 1 中没有发现对应单菌 A12-3i 的条带。由 DGGE 图谱可知, A1 复合菌系在培养 48h 时,其中的优势菌是 *L. plantarum* 和 *L. kimchii*,分别对应于平板分离得到的 3 株单菌中的两株。*L. farciminis* 在 Lane1 中并没有检测到。

2.3 16S rDNA 克隆文库的结果

为了更全面的了解 A12 复合系的菌种组成多样性,对 A12 复合系的 16S rDNA 全长的 PCR 产物建立了克隆文库,经蓝白筛选共得到 200 多个白色菌落。随机选取其中的 96 个菌落对其 16S rDNA 的 V_3 区

域做菌落 PCR,利用 DGGE 进行筛选(图 3),最后获得了 7 种不同迁移位置的条带,在 DGGE 图谱上分别以 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7 表示,经 16S rDNA 测序结果近缘种分别为:*Lactobacillus farciminis* (100%)、*Lactobacillus farciminis* (100%)、*Lactobacillus plantarum* (99.9%)、*Lactobacillus pentosus* (99.8%)、*Lactobacillus kimchii* (99.4%)、*Lactobacillus kimchii* (98.2%)、*Lactobacillus pentosus* (99.6%) (图 2 Lane5 ~ 11,表 1)。其中克隆子 C2、C3 和 C5 的条带与分离单菌 Al2-3i、Al2-1i 和 Al2-2i 的条带位置相同,并且测序结果也一致。由此,通过建立克隆文库在 Al2 复合系中共检测出 7 种细菌,全部为 *Lactobacillus* 的近缘种。

在 16S rDNA 克隆文库中,所占比例最多的是 C3(*L. plantarum*),达到 55%,其次是 C5(*L. kimchii*)

和 C2(*L. farciminis*),比例各占 19.79% 和 14.58%。这 3 种克隆占到整个克隆文库的 90%,而这 3 种菌也是可被分离的菌种。而其余 4 种克隆只占到克隆文库的 10%,这 4 种未被培养出来,是由于所占比例太小还是因为是难培养物,还有待于进一步研究。

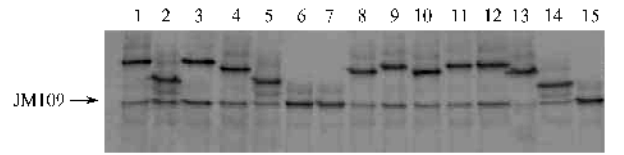


图 3 对克隆筛选的变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱
Fig.3 DGGE profile of 16S rDNA V₃ region of clone druing screening. Lane6,7,15 are self-connected, the band is belonged to JM109. 3 kinds of clones are detected in the gel. Lane1,3,9,11,12 are the same kinds of clones, lane 2,5,14 are the other kinds of clones, and lane4,8,10,13 are another group of clones.

表 1 Al2 复合菌系组成菌的测序结果

Table 1 Sequencing results of populations of Al2

Name	Lane ^a	Closest relative (accession number)	Identity/ %	Accession Number	DGGE	Isolated	Cloning
Al2-1i	2	<i>L^b. plantarum</i> (AB104855)	99.9	DQ056419	+ ^c	+	+
Al2-4c	7	<i>L. plantarum</i> (AB104855)	99.9	DQ056422			
Al2-2i	3	<i>L. kimchii</i> (AF183558)	99.4	DQ056420	+	+	+
Al2-5c	9	<i>L. kimchii</i> (AF183558)	99.4	DQ056423			
Al2-3i	4	<i>L. farciminis</i> (AJ417499)	100	DQ056421	-	+	+
Al2-6c	6	<i>L. farciminis</i> (AJ417499)	100	DQ056424			
Al2-7c	8	<i>L. pentosus</i> (D79211)	99.8	DQ056425	-	-	+
Al2-8c	5	<i>L. farciminis</i> (AJ417499)	100	DQ056426	-	-	+
Al2-9c	10	<i>L. kimchii</i> (AF183558)	98.2	DQ056427	-	-	+
Al2-10c	11	<i>L. pentosus</i> (D79211)	99.6	DQ056428	-	-	+

^a Lanes are shown in Fig. 1 ;^b Abbreviation : *L.*, *Lactobacillus* ;^c “+” detected ; “-” not detected.

2.4 Al2 菌系培养 F₂₇ ~ F₃₃ 代菌群的动力学

在 Al2 继代培养中,将 27 代至 33 代各培养 24h 的样品提取 DNA 后 PCR 16S rDNA V₃ 区域,将 PCR 产物做 DGGE 分析(图 4-A),结果可检测到的主要条带为 ① *Lactobacillus plantarum* 和 ② *Lactobacillus kimchii*。 *L. plantarum* 呈现的条带浓厚,且各代间相当稳定, *Lactobacillus kimchii* 呈现条带微弱。从 Al2 各代的菌群动态变化来看,说明 Al2 菌系 7 带间菌群变化基本稳定。

2.5 第 33 代连续培养 72h 中菌群的动力学

将第 33 代 Al2 复合系在 MRS 培养基 72h 内的动态样品做 DGGE 分析, *L. plantarum* 始终条带浓厚(图 4-B) ; *L. kimchii* 在 3 ~ 24h 有微弱的条带,而在 48 ~ 72h 条带变浓。可以认为 *L. plantarum* 始终占优势地位,而 *L. kimchii* 到培养 48h 后才成为优势菌。在此 DGGE 分析中只能检测到 2 种菌。

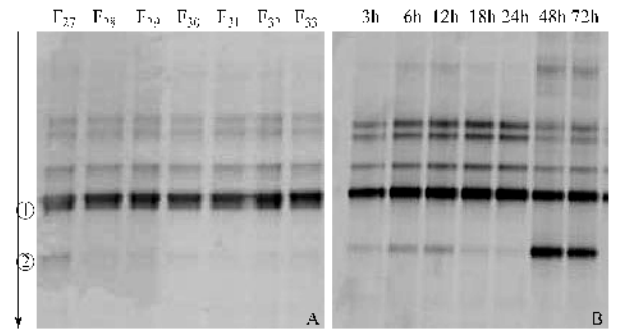


图 4 Al2 复合菌系在 MRS 培养基中各代变化(A)及随时间动态变化(B)的变性梯度凝胶电泳图谱
Fig.4 DGGE patterns of Al2 community cultivated in MRS media. A : The patterns obtained by 24h cultivation in MRS media from F₂₇ successive subcultured to F₃₃ ; B : Dynamic changes of microorganism of Al2 community cultivated in MRS media for 72h. Band ① is *Lactobacillus plantarum*, Band② is *Lactobacillus kimchii*.

3 讨论

自从 1993 年 DGGE 技术被引入微生物生态学以来,该技术被广泛地用作分子工具比较微生物群落的多样性和监视种群动态。并且随着分子生态学的发展,国际上 DGGE 技术通常与传统的平板分离技术以及末端限制酶片段长度多态性技术 (T-RFLP) 和 16S 克隆文库相结合,来更加准确地分析微生物群体的多样性。在乳酸菌的研究中,DGGE 与克隆文库相结合分析微生物群体多样性是非常有效的手段,可获得更多有关微生物群落成员特性的信息。近年来相继报道了奶制品,香肠制作过程中复杂的生态系统的变化^[14,15],但在青贮接种剂及青贮过程中的微生物区系变化还未有报道。

L. plantarum 是经常在青贮料中分离到的同型发酵乳酸菌,*L. kimchii* 是经常在韩国泡菜中分离的专性异型发酵乳酸菌,*L. farciminis* 是经常在香肠及肉制品中分离的专性同型发酵乳酸菌。最近国外报道利用 *Lactobacillus pentosus* 做接种剂,利用经过湿氧化法处理的小麦秸秆产生的半纤维素水解物 (HH) 产乳酸研究^[16],它为兼性异型发酵乳酸菌。有研究表明接种同型发酵乳酸菌会削弱青贮饲料的有氧稳定性^[17],而接种异型发酵乳酸菌则能提高青贮牧草的有氧稳定性^[18],因此国外有学者将同型发酵菌和异型发酵菌混合作为青贮饲料的接种剂,试验证实混合接种有效地抑制了酵母菌的活动,提高了饲料的有氧稳定性^[19]。本研究中,A12 复合菌系是包括同型发酵乳酸菌和异型发酵乳酸菌在内的乳酸菌复合菌系,发现有 7 株组成菌,其中通过平板培养只能分离到 3 株,而通过克隆文库除了已分离的 3 株菌外还可以检测到 4 株微生物,这些菌株的多样组合可能是该复合系稳定的基础。

16S rDNA 克隆文库中每种克隆的数量可以定量的反映复合菌系中每种组成菌的数量。由 A12 得到的 96 个克隆中,C3 占到克隆总数的 55.21%,C5 达到 19.79%,C2 为 14.58%,这 3 种克隆占到了整个克隆的将近 90%。而其余 4 种克隆只占 10% 左右。这个结果与平板分离的结果一致,平板的菌落中也是这 3 种菌最多。通过 DGGE 只检测到 *L. plantarum* 和 *L. kimchii* 的条带,未能检测到 *L. farciminis*。这些结果除了 DGGE 方法局限性外也有可能是 MRS 培养基最适合这两种菌,而 *L. farciminis* 由于细胞数太少没有达到 DGGE 检测的最低限。

参 考 文 献

- [1] McAllister TA, Feniuk R, Mir Z, *et al.* Inoculants for alfalfa silage: on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Production Science*, 1998, **53**(2): 171 – 181.
- [2] Weinberg ZG, Muck RE. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiological Reviews*, 1996, **19**(1): 53 – 68.
- [3] McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. *Microorganisms In The Biochemistry of Silage*. 2nd eds, UK: Chalcombe Publications, 1991, 81 – 151.
- [4] Spoelstra SF. Chemical and biological additives in forage conservation. In: *Proceedings of a Conference on Forage Conservation Town 'ds 2000* (Pahlow, G. and Honig, H., Eds.). Germany: Braunschweig, 1991, 48 – 70.
- [5] Henderson N. Silage additives. *Anim Feed Sci Technol*, 1993, **45** (1): 35 – 56.
- [6] 王小芬,崔宗均,胡跃高,等. 苜蓿青贮接种菌系 Li6、A12、Ru2 的筛选及其发酵特性. *草地学报*, 2004, **12**(2): 124 – 128.
- [7] Stevenson DM, Muck RE, Shinnors KJ, *et al.* Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Appl Microbiol Biot*, 2006, **7**(3): 329 – 338.
- [8] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, *et al.* Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol*, 2001, **42**(2): 199 – 202.
- [9] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(22): 5278 – 5280.
- [10] Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(2): 695 – 700.
- [11] Pedro MS, Haruta S, Hazaka M, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91**(2): 159 – 165.
- [12] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl Microbiol Biot*, 2002, **59**(5): 529 – 534.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, *et al.* Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Envir Microbiol*, 2002, **68**(4): 1882 – 1892.
- [15] Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, *et al.* Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Envir Microbiol*, 2004, **70**(4): 1883 – 1894.

- [16] Garde A, Jonsson G, Schmidt AS, *et al.* Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 2002, **81** (2) : 217 – 223.
- [17] Weissbach F. New developments in crop conservation. In : Jones DIH, Jones R, Dewhurst R, *et al.* (eds) Proceedings of the 11th International Silage Conference. Aberystwyth : Institute of Grassland and Environmental Research, 1996, 11 – 25.
- [18] Driehuis F, Elferink SJWHO, Van Wijkelaar PG. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 2001, **56**(4) : 330 – 343.
- [19] Filya I, Ashbell G, Hen Y, *et al.* The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 2003, **86**(5) : 3575 – 3581.

Composition diversity of lactic acid bacteria (LAB) community A12 used for alfalfa silage

WANG Xiao-fen, GAO Li-juan, YANG Hong-yan, WANG Wei-dong, CUI Zong-jun *

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract : Alfalfa is the most important forage grass that is difficult to ensile for good quality. Using silage inoculants are the important way for preservation of alfalfa silage. Through continuous restricted subcultivation, a lactic acid bacteria (LAB) community A12 was selected from well-fermented alfalfa silage. Plate isolation and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), construction of 16S rDNA clone library were used to identify the composition diversity of A12 community, with 7 strains detected, and they were all belonged to *Lactobacillus*. The composition ratios of the 7 strains were 55.21%, 19.79%, 14.58%, 3.13%, 3.13%, 3.13%, 1.03% according to 16S rDNA clone library. A12-1i, A12-2i, A12-3i, corresponding to *L. plantarum* (99.9%), *L. kimchii* (99.4%), *L. farciminis* (100%) were detected by plate isolation. Among 3 isolates, A12-1i had the highest ability of dropping pH and producing lactic acid, and the amount of lactic acid was reach to 18g/L at 24h cultivated in MRS media. The ability of dropping pH and producing lactic acid of A12-3i was the lowest. From DGGE profiles, the dominant strains in A12 community were *L. plantarum* and *L. kimchii*. *L. plantarum* was detected during the whole process, and *L. kimchii* was detected in the later phase.

Keywords : Lactic acid bacteria (LAB) ; Community ; DGGE ; 16S rDNA clone library ; Composition diversity

* Corresponding author. Tel : 86-10-62733437 ; E-mail : acuijzj@cau.edu.cn

Other author : LV Yu-cai

Received : 24 November 2005 / Accepted : 16 January 2006 / Revised : 3 April 2006