

水稻秸秆低温复合菌系多样性及发酵动态

杨洪岩^{1,2}, 袁旭峰², 刘小平², 王小芬², 崔宗均^{2*}

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

²中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193

摘要:【目的】为解决中国寒冷地区水稻秸秆大面积废弃问题, 加快低温地区水稻秸秆饲料转化, 本文筛选了可以低温下加速秸秆发酵过程的微生物复合菌系, 研究其微生物组成并跟踪其发酵动态。【方法】通过5℃下连续定向富集筛选, 获得低温复合菌系。采用克隆文库方法分析复合菌系的组成。将复合菌系和商业接种剂(由 *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *L. salivarilus*, *Pediococcus acidilactici* 组成) 分别接入稻秸进行10℃发酵。气质联机(GC-MS)测定发酵产物的同时, 通过变性梯度凝胶电泳检测微生物在发酵体系的定殖情况。采用定量PCR方法追踪复合菌系组成菌在发酵过程中的动态。【结果】16S rDNA 克隆文库分析结果表明复合系主要由两种微生物组成, 一种属乳酸杆菌(*Lactobacillus*), 一种属乳酸球菌(*Leuconostoc*)。10℃稻秸发酵结果表明, 在发酵第6天接种复合菌系处理的pH已经下降到4.3, 乳酸菌菌落形成单位为 2.9×10^9 CFU/g 鲜样, 而接种商业接种剂的处理pH为5.3, 乳酸菌菌落形成单位为 3.6×10^8 CFU/g 鲜样; 在发酵30d时, 接种复合菌系处理的乳酸含量为8.1 g/kg 鲜样, 接种商业接种剂处理的乳酸含量为2.0 g/kg 鲜样。变性梯度凝胶电泳结果表明, 在接种复合菌系的稻秸中, 从发酵的第6天开始, 检测到的微生物主要为 *L. sakei* 和 *Leuconostoc inhae*, 在整个发酵过程中, 两菌一直存在; 在商业接种剂处理中, 发酵第6天检测到的微生物除其四种组成菌外, 还包括 *Uncultured bacterium*; 而在发酵第16天和第30天, 只检测到组成菌中的 *L. plantarum* 和 *E. faecium*。定量PCR结果显示, 接种复合菌系处理中, *L. sakei* DNA 在发酵第6天达到41.0%, 在发酵第16天已达到65%, *Le inhae* 在发酵的第6天达到整个发酵过程中的最大值(5.5%)。【结论】接种复合菌系, 可以有效促进水稻秸秆的低温发酵进程。复合菌系组成菌可以定殖在发酵体系中, 并占据优势。复合菌系的关键菌为 *L. sakei*。

关键词: 水稻秸秆, 发酵饲料, 低温, *Lactobacillus sakei*

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1248-08

中国是一个农业大国, 随着种植及栽培技术的不断提高, 粮食产量逐年增加, 同时也产生了大量的农作物秸秆。过去相当长的一段时间内, 秸秆都以

直燃的方式作为能源使用, 而随着农村经济的发展及薪柴结构的改善, 农村能源消费中秸秆利用的数量越来越少, 更多的秸秆成为废弃物。这些废弃的

基金项目: 国家公益性行业(农业)专项(200803033-B0502); 国家科技支撑计划(2007BAD89B07-A); 中央高校基本科研业务费专项基金(41411200)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62731857; Email: acuizj@cau.edu.cn

作者简介: 杨洪岩(1979-), 女, 黑龙江绥化人, 讲师, 博士, 主要研究方向为生物质资源综合利用及微生物生态。Email: ayanghy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-02-28; **修回日期:** 2011-05-09

秸秆在田间随意堆弃或就地焚烧,造成了严重的环境污染和巨大的资源浪费^[1]。

目前中国秸秆利用方式主要是用作能源、直接还田、饲料、工业原料及食用菌基料等。由于各地经济发展水平、产业结构不同,其利用方式也不相同^[2]。在我国东北水稻主产区,水稻秸秆产量占全国总产量的14%^[3]。该地区秸秆利用的诸多途径中,秸秆新能源转化利用的研究多处于研发阶段,转化利用量不大;秸秆还田的数量虽然有所增加,但多受到冬春季的长期低温及干旱限制,效果并不理想;秸秆作为饲料在该地区已经有相当长的历史,这种利用方式不仅可以为人们增加动物蛋白,更成为解决秸秆污染问题现实而有效的途径。

由于冬季持续时间长,东北地区反刍动物饲料资源缺乏。虽然秸秆可以直接作为牲畜饲料,但由于其主要成分为木质纤维素,严重影响作为饲料的适口性。很多实践表明,青贮发酵可以有效提高饲料的适口性^[4]。对于收获后的干黄秸秆,采取常温微生物接种对其发酵也已获得了成功^[5]。在东北地区秋冬春季的低温成为了限制秸秆发酵的瓶颈,能否利用低温微生物促进秸秆发酵、提高饲料适口性,成为秸秆低温饲料转化亟待解决的问题,至今还未见有关于利用低温微生物解决水稻秸秆发酵饲料转化的研究报道。

笔者采用低温连续富集培养的方法,筛选获得了一组低温复合菌系。本文对其组成多样性进行研究,对其在发酵体系中的动态进行追踪。以此作为扩大化研究的基础,为加速寒地废弃水稻秸秆发酵饲料转化提供有效的参考依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

稻秸采收于黑龙江省绥化市(北纬46.6',东经126.8'),含水量9%(W/W);商业接种剂(CI)为Sil-All 4×4(Alltech, USA),主要由*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus*组成;微生物培养及化学分析所用试剂均购自北京化学试剂公司;DNA提取试剂及RNA酶购自北京经科宏达生物技术有限公司;普通PCR扩增试剂购自宝生物工程(日本)有限公司(Takara, Japan);PCR产物采用QIAquick PCR产物

纯化试剂盒纯化(Qiagen, USA);克隆文库试剂盒为pGEM-T Easy(Promega, USA);定量PCR采用Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR green I(Roche, USA)试剂盒进行分析。

气相色谱质谱联用仪(GC-MS)型号为GC-QP2010(日本岛津公司),分析柱为CP-Chirasil-Dex CB型毛细管柱;普通PCR仪型号为ABI 9700(Applied Biosystems, USA);定量PCR分析系统为LightCycler(Roche, USA)系统。

1.2 发酵

本研究中的复合菌系为笔者通过长期5℃静置液体富集培养获得,初始微生物源样品为黑龙江省绥化市水稻田土壤。复合菌系培养采用R-MRS培养基,即将稻秸按1%(W/V)的比例添加到MRS^[6]培养基中作为培养基质。复合菌系5℃液体培养6天后用于后续实验。

将风干后的稻秸剪至1cm左右,向其中添加葡萄糖使秸秆最终含糖量达到7%(W/W)^[7]。商业接种剂(CI)及本实验中筛选的复合微生物(SFL)分别以 1×10^6 CFU/g比率接入到秸秆中,不接任何微生物的处理作为无接菌对照(Control)。向秸秆喷水使得最终混合物含水率达70%,装于100ml玻璃瓶中密封,10℃压氧发酵。在发酵的第2、6、10、16、30天开瓶取样,测定pH、挥发性发酵产物及微生物多样性及动态监测。

1.3 微生物菌落计数及挥发性产物分析

乳酸菌落计数采用平板梯度稀释法,培养基为固体R-MRS培养基;pH值采用微型pH计进行测定;挥发性发酵产物采用气相色谱质谱联用仪进行测定,将1.5g的发酵稻秸浸入4.5mL的灭菌蒸馏水中,室温静置30min,5800×g离心,0.22μm过滤后,1μL汁液用于进样分析,进样分流比20:1(V/V),进样口温度190℃,离子源温度200℃,接口温度200℃,检测器电压0.7kV,载气为氦气,柱头压75kPa,总流量34.1mL/min,柱温程序为:起始温度60℃,保持1min,以7℃/min升至100℃,维持1min,以18℃/min比率升至195℃,保持2min。数据经GCMS solution V2.4 data processing system分析。每个样品重复3次。

方差分析采用SAS统计分析软件分析(Version 6.12, SAS, Inst. Inc., Cary, NC)。

1.4 变性梯度胶电泳

采用氯苯法提取样品及复合微生物DNA,经RNA酶纯化后,作为PCR的模板,所用的引物及程序参见文献[8]。变性梯度胶电泳(DGGE)方法参

见文献[7]。胶上回收的条带利用引物 357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 517R (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG-3') 进行扩增, PCR 产物经纯化后用于测序。

1.5 克隆文库

细菌 16S rDNA 克隆文库的构建参见文献[9]。随机选取 200 白色菌落, 通过 DGGE 筛查, 选取具有不同位置的菌落进行测序, 测序所用引物为 T7, 515F 及 Sp6^[10]。序列相似性通过 GenBank 数据库比对以后, 利用 Mega4[11] 软件构建系统进化树, 本研究中所应用序列保存于 GenBank 数据库中, 对应的登录号为 EF590122-EF590135。

1.6 定量 PCR

特异引物的设计使用软件 PRIMROSE^[12]。所设计引物经 RDP II 数据库中 Probe_Match 工具测试。根据克隆数据库结果, 经平板培养分离, 单菌 SFL-A 与 SFL-B, 将单菌的 DNA 用于制作标准曲线。发酵稻秸的 DNA 用于样品分析。所有 DNA 利用荧光定量试剂盒 (Bio-Rad, USA) 定量后用于后续分析。定量 PCR 每个反应体系包括如下试剂: LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, 2 μ L; 25 mM MgCl₂, 1.2 μ L (for SFL-A) or 1.6 μ L (for SFL-B); 正向及反向特异引物 (10 μ M) 各

1 μ L, PCR 级水定容至 18 μ L, 最后加入 2 μ L 的 DNA 模板溶液。每个样品做两次重复。

SFL-A 的特异性引物对为 A-278F (5'-GGTAAAGGCTCACCAAGACC-3') and A-467R (5'-TACCGTCACTACCTGATCAG-3'), SFL-B 的特异性引物对为 B-456F (5'-TGGGAAGAACAG-CTAGAG TAG-3') 和 B-612R (5'-TCCAATGCCTTTCCGG AGTT-3')。定量 PCR 的程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 随后按变性 95 $^{\circ}$ C 5 s, 退火 65 $^{\circ}$ C 6 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s 程序扩增 40 个循环, 荧光检测在延伸阶段进行。除退火到延伸阶段温度变化比率为 2 $^{\circ}$ C/s, 其余变化比率均为 20 $^{\circ}$ C/s。扩增产物的特异性用溶解曲线进行分析 (Kato et al., 2005), 分析程序为 95 $^{\circ}$ C 变性, 70 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 然后以 0.1 $^{\circ}$ C/s 比率上升到 95 $^{\circ}$ C, 检测此间荧光信号变化。

2 结果

2.1 复合菌系的微生物组成

本研究采取直接构建 16S rDNA 克隆文库的方法分析复合系的组成。系统进化分析如图 1, 结果表明, 在所分析的 200 个白色菌落中, 158 个属于 *Lactobacillus*, 与 *L. sakei* 具有 99.9% 的相似率, 42

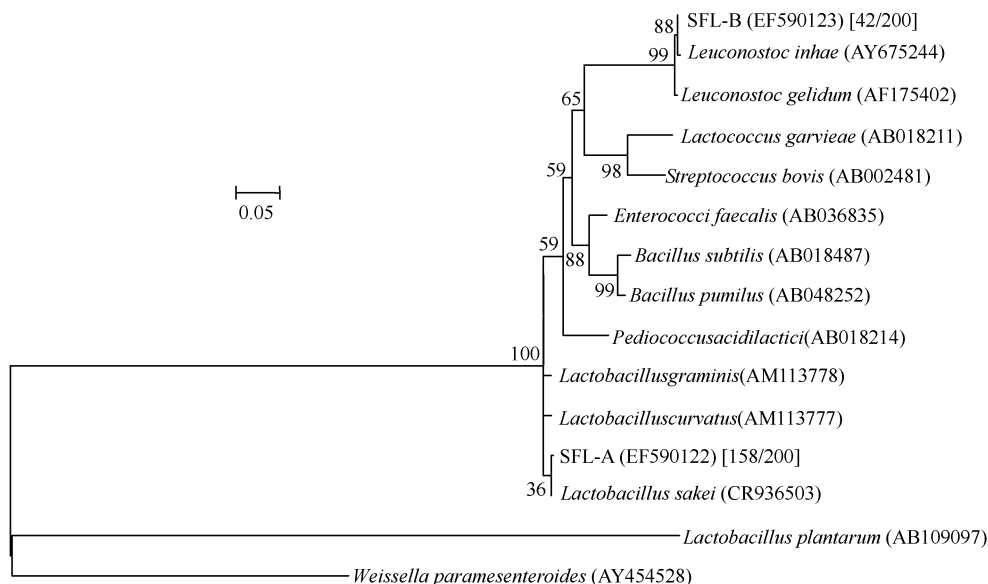


图 1 16S rDNA 系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic tree derived from partial 16S rDNA sequence. "SFL-A" and "SFL-B" refers to the clones. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

个属于 *Leuconostoc*, 与 *Le. inhae* 具有 99.4% 的相似率。

根据克隆文库的结果, 分离到与 SFL-A 和 SFL-B 分别具有相同序列的代表菌株。两菌染色结果均为革兰氏阳性, 过氧化氢酶反应阴性, 不运动, 不水解淀粉。SFL-A 可在 5 - 42℃ 范围内生长, 最适生长温度为 30℃, 发酵葡萄糖主产物为乳酸; SFL-B 可以 5℃ - 37℃ 范围内生长, 最适生产温度为 22℃, 发酵葡萄糖主产物为乳酸和乙酸。

2.2 低温下接种效果

为测试所筛选复合菌系 SFL 的低温发酵秸秆效果, 分别将 SFL 及商业接种剂 CI 接种到水稻秸秆中, 进行 10℃ 下的发酵效果比较。测定项目包括 pH、乳酸菌落数、挥发性发酵产物以及复合菌系在发酵体系中的定殖情况。

2.2.1 秸秆发酵过程中 pH 动态: pH 值下降程度是指示秸秆进入发酵状态迅速与否的关键指标之一。如图 2 所示, 在 10℃ 时接种与未接种的处理 pH 均呈现下降趋势。经过 6 d 的发酵, 接种后的发酵秸秆 pH 比不接种处理的显著降低 ($P < 0.05$), 表明添加接种剂可以明显加快稻秸 pH 的下降速度。发酵 6 d 后, 接种 SFL 的处理 pH 下降到 4.5 以下, 发酵 10 d 时, pH 下降到 4.0 左右, 此时接种商业接种剂 (CI) 的处理 pH 为 4.5。此结果表明, 与 CI 比较 SFL 可以使秸秆的 pH 下降更为迅速。

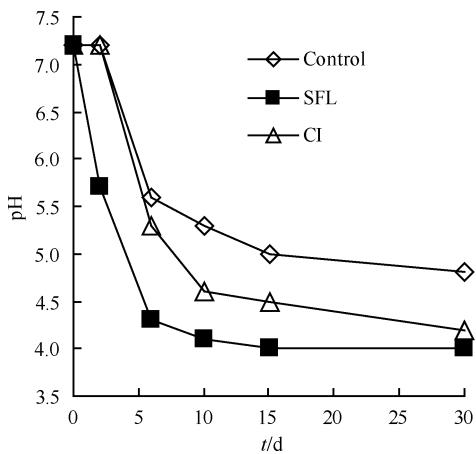


图 2 10℃ 发酵过程中的 pH 动态

Fig. 2 Changes of pHs during the fermentation at 10°C. Control, the treatment without the inoculant; SFL, the treatment with the SFL; CI, the treatment with the commercial inoculant.

2.2.2 乳酸菌落计数: 乳酸菌是调制发酵饲料的主

角, 其增殖程度直接影响发酵饲料的品质。如图 3 所示, 在 10℃ 下所有处理的乳酸菌数在发酵第 6 天时达到最大值, 之后开始下降。在发酵初期, 与接种处理比较, 未接种处理中检测到的乳酸菌数明显少于接种处理; 在接种处理中, SFL 的乳酸菌数比 CI 的数量更高 ($P < 0.05$), 在 30 d 发酵结束时, 其数目比 CI 及对照的低 ($P < 0.05$)。表明向秸秆发酵体系中接入乳酸菌, 可以使乳酸菌迅速增殖; 在低温条件下, 与接种 CI 处理比较, 接种 SFL 可使乳酸菌增殖更为迅速, 快速产酸并使 pH 下降, 即接种 SFL 的水稻秸秆处理可以较早地进入发酵状态。

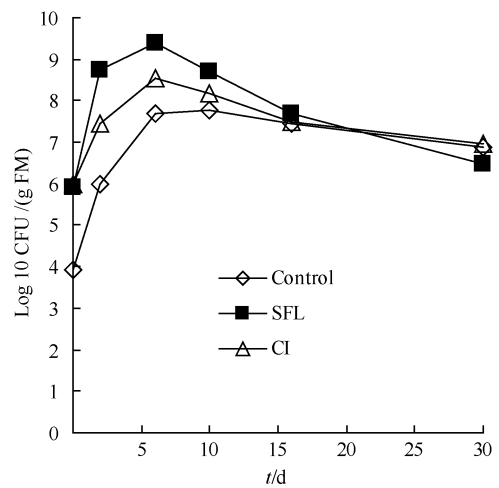


图 3 10℃ 发酵稻秸乳酸菌落数变化

Fig. 3 Changes in CFUs of LAB at 10°C. CFU, colony forming unit; Control, the treatment without the inoculant; FM, fresh matter; SFL, the treatment with the SFL; CI, the treatment with the commercial inoculant.

2.2.3 挥发性发酵产物分析: 通过 GC/MS 所测定的发酵产物分析表明 (表 1), 接种剂的添加可以显著增加乙醇的浓度 ($P < 0.05$)。就甘油来说, 是否接种对其质量分数并没有明显影响。而对乳酸与乙酸来说, 用 SFL 处理过的发酵秸秆浓度分别达到 8.1 和 1.5 g/kg 鲜样 (FM), 这两种物质的质量分数均显著高于接种 CI 的发酵秸秆 ($P < 0.05$)。对挥发性产物测定结果表明, 接种 SFL 使得低温水稻秸秆发酵产生更多有助于提高发酵饲料品质的风味物质^[7]。接种 SFL 明显提高了乳酸的含量, 不仅有助于提高动物采食量, 而且还可起到利于动物肠道优势种群的建立与维系, 促进矿物养分的吸收利用等重要作用^[13]。

表 1 稻秸 10℃ 发酵 30 d 后挥发性产物分析

Table 1 Volatile products after 30 d fermentation at 10℃

| Treating | Ethanol (g/kg FM) | Acetic acid (g/kg FM) | Lactic acid (g/kg FM) | Glycerol (g/kg FM) |
|----------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Control | 0.2 ^a * | 1.1 ^b | 0.0 ^b | 0.3 ^a |
| CI | 1.6 ^a | 0.7 ^c | 2.0 ^b | 0.4 ^a |
| SFL | 1.0 ^b | 1.5 ^a | 8.1 ^a | 0.1 ^b |

* Data in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$); FM, fresh matter.

2.2.4 秸秆发酵体系中复合菌系的定殖:为研究微生物接入到水稻秸秆发酵体系后整个微生物群体的演替情况,提取稻秸原位菌、商业接种剂 CI、SFL 及其相应接种处理的发酵稻秸微生物 DNA,采用 PCR-DGGE 方法对发酵 6 d、16 d 和 30 d 的稻秸中微生物区系变化进行了分析。

如图 4 所示,在 10℃ 发酵整个过程中,在未接种处理中检测到了更多的微生物种属,而在接种处

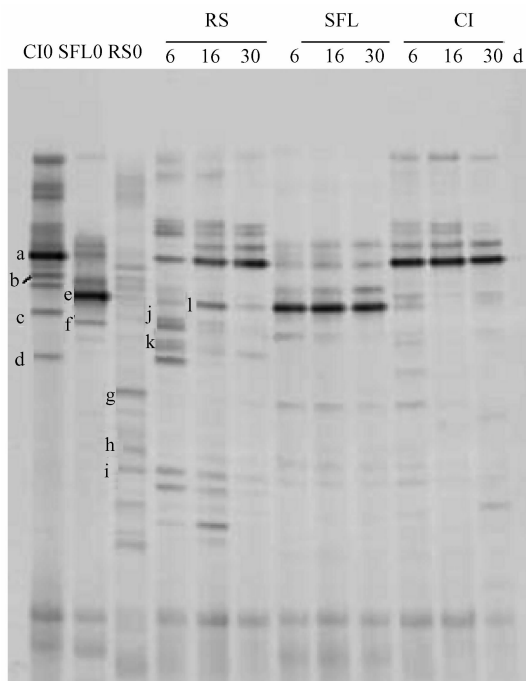


图 4 10℃ 发酵样品 DGGE 动态

Fig.4 DGGE profiles of the samples at 10℃. CI0, the commercial inoculant; SFL0, the community in this study; RS, rice straw; CI, the treatment with the commercial inoculant; SFL, the treatment with the SFL; RS, rice straw; a, *Lactobacillus plantarum* (100%); b, *Enterococcus faecium* (100%); c, *L. salivarilus* (100%); d, *Pediococcus acidilactici* (100%); e, *L. sakei* (100%); f, *Leuconostoc inhae* (100%); g, Uncultured bacterium (98.2%); h, Uncultured bacterium (99%); i, Uncultured bacterium (100%); j, *Pseudomonas lutea* (100%); k, *Acinetobacter johnsonii* (100%); l, *Gamma proteobacterium* (100%).

理中相对较少,说明接入乳酸菌后杂菌的种类受到接种剂的抑制而明显减少。接种 SFL 处理在发酵第 6 天主要检测到 SFL 的组成菌;接种 CI 处理在发酵第 6 天,可以检测到除 CI 组成菌以外的微生物,在发酵 16d 后,微生物才逐渐变少。比较接种 SFL 与 CI 的处理,可以看出接种 SFL 处理在发酵第 6 天微生物种类已明显减少,说明该处理的杂菌在发酵初期就已经得到明显抑制。SFL 的组成菌在 DGGE 图谱上均可以检测到,说明 SFL 在发酵体系中可以有效定殖。

2.3 复合系组成菌在秸秆发酵过程中的定量分析

荧光定量最终结果见图 5,在发酵的前 6 d 组成菌 SFL-A 与 SFL-B 的 DNA 含量急剧变化,到发酵的 16 d,两者的总 DNA 量已经达到整体的 68%。对于组成菌 SFL-A,在发酵的前 16 d,DNA 含量不断增加,达到了总体的 65%;对于组成菌 SFL-B,在发酵的第 6 天,DNA 含量为 5.5%,达到整个发酵过程中的最大值。比较 SFL-A 与 SFL-B 可以看出,SFL-A 占有绝对优势,结合 SFL-A 的生物学特性,可以推测 SFL-A 为复合菌系的关键菌。

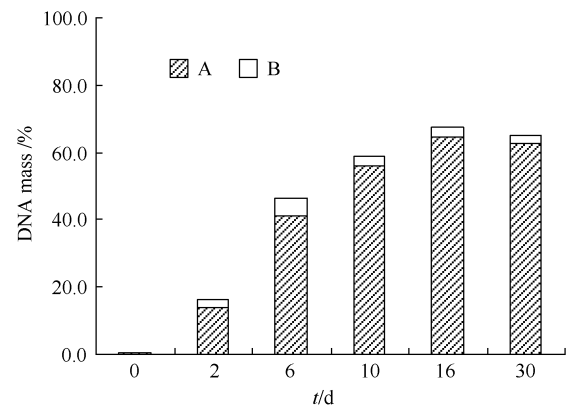


图 5 稻秸发酵过程中 SFL 组成微生物的相对含量

Fig.5 Relative abundance of composition microorganism of the SFL during ensiling the rice straw. Values were the means of two replicates. DNA mass of SFL - A and SFL - B in the control was under detected limit.

3 讨论

秸秆作为反刍动物饲料已经有相当长的历史,但由于收获后的秸秆主要成分为木质纤维素,质地粗硬,直接饲喂品质差,动物采食量低。采用发酵的方法可以有效保存秸秆的营养成分,提高饲料的适口性,是一种提高秸秆饲料品质的主要手段^[7, 14]。在制作秸秆发酵饲料时,为更好地提高发酵品质或加快发酵速度,常常会向发酵体系中添加影响发酵的关键因子——糖和/或微生物。Weinberg 等^[15]向秸秆中联合添加废弃乳制品及糖蜜,使秸秆发酵饲料中的乳酸含量得以明显提高,饲料品质得到明显改善。李大鹏^[16]向采摘玉米后的半干玉米秸秆中添加乳酸菌,发酵后的饲料的 pH 值、气味、色泽、质地等均优于不添加乳酸菌的发酵产物。高丽娟等^[5]将筛选的常温乳酸菌复合系接种于水稻、玉米、小麦秸秆,发现接种复合系的秸秆发酵产物中乳酸含量极显著提高,并检测到提高饲料风味的乙醇、甘油等物质。综合国内外的研究结果发现,发酵通常在常温下进行,对于在低温下向秸秆中接种微生物菌剂进行发酵的研究尚属空白。

本研究为调查低温下秸秆发酵的可行性,利用实验室规模将秸秆进行 10℃ 发酵。与常温下应用的商业接种剂比较,本研究中所筛选的复合菌系可以使发酵稻秸在低温下 pH 下降更为迅速,并产生更多量的乳酸,该结果表明,接种复合菌系可以改善发酵品质,并可在低温下加速秸秆的发酵进程。这是第一次利用复合菌系对水稻秸秆进行 10℃ 发酵,并对复合菌系进行系统的研究。近期,笔者在黑龙江省肇源县进行了实地发酵试验,在 3m³ 的发酵规模下将复合菌系 SFL、SFL-A、SFL-B 分别接种于发酵体系中,发酵结果表明接种 SFL 的处理乳酸含量明显高于接种 SFL-A 和 SFL-B 的处理,开窖后的有氧稳定性又好于 SFL-A 处理,显示其在实际生产中的应用潜力。

克隆文库结果揭示了复合系包含两种乳酸菌,一种与 *L. sakei* 具有 99.9% 的相似率,一种与 *Le.*

inhae 具有 99.4% 的相似率。这两种菌,均属低温乳酸菌,以前多见于肉制品的冷藏过程中^[17-19],对于这种低温乳酸菌在发酵饲料方面的利用还未见报道^[20]。对这两种菌进行发酵过程的定量分析,可以看出在整个发酵过程中 SFL-A 在数量上占有绝对优势,表明其在发酵过程中起着关键作用。

4 结论

筛选到的复合菌系可以在低温下快速生长并产乳酸;复合菌系可以在 10℃ 下有效定殖在水稻秸秆低温发酵体系中,使水稻秸秆更早地进入发酵状态,明显加速秸秆发酵进程;克隆文库结果显示,复合系主要由两种微生物组成,一种属乳酸杆菌 (*Lactobacillus*),另一种属于乳酸球菌 (*Leuconostoc*),前者在秸秆发酵过程中起着关键作用,为复合系的关键菌。

参考文献

- [1] Liu RG, Yu H, Huang Y. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose*, 2005, 12: 25-34.
- [2] 崔明, 赵立欣, 田宜水, 孟海波, 孙丽英, 张艳丽, 王飞, 李冰峰. 中国主要农作物秸秆资源能源化利用分析评价. 农业工程学报 (*Chinese Society Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*), 2008, 24(12): 291-296.
- [3] 国家统计局. 2009 年农产品产量. <http://219.235.129.58/reportYearQuery.do?id=1400>
- [4] Kim W, Yahaya MS, Goto M. Effects of steam explosion on the chemical composition and rumen degradability of rice (*Oryza sativa* L.) straw. *Grassland Science*, 2005, 51: 139-144.
- [5] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 吕育才, 崔宗均. 乳酸菌复合系 SFC-2 处理水稻秸秆的效果. 环境科学 (*Environmental Science*), 2007, 28(6): 1392-1396.
- [6] De Man J, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1972, 23: 130-135.

- [7] Yang HY, Wang XF, Liu JB, Gao LJ, Ishii M, Igarashi Y, Cui ZJ. Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101 (3): 232-237.
- [8] Yang HY, Gao LJ, Wang XF, Wang WD, Cui ZJ. Effects of cultivation conditions on the diversity of microbes involved in the conversion of rice straw to fodder. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19 (1): 67-73.
- [9] Wang XF, Haruta S, Wang P, Ishii M, Igarashi Y, Cui ZJ. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57: 106-115.
- [10] Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, de Vos WM, Vaughan EE. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 1882-1892.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [12] Ashelfold KE, Weightman AJ, Fry JC. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 3481-3489.
- [13] 杨永明, 卢德勋, 卢媛. 微生物发酵秸秆饲料的研究现状及展望. *饲料工业 (Feed Industry)*, 2002, 23 (2): 14-18.
- [14] Weinberg ZG, Muck RE. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19: 53-68.
- [15] Weinberg ZG, Ashbell G, Chen Y. Stabilization of returned dairy products by ensiling with straw and molasses for animal feeding. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86: 1325-1329.
- [16] 李大鹏. 玉米秸秆青贮饲料添加剂的研究. *粮食与饲料工业 (Cereal & Feed Industry)*, 2002, (5): 29-30.
- [17] Dykes GA, Cloete TE, von Holy A. Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum packaged Vienna sausage by DNA-DNA hybridization. *Food Microbiology*, 1994, 11: 271-274.
- [18] Samelis J, Kakouri A, Georgiadou KG, Metaxopoulos J. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84: 649-660.
- [19] Martín B, Jofré A, Garriga M, Pla M, Aymerich T. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 6040-6048.
- [20] 杨洪岩, 王小芬, 崔宗均. 低温环境中乳酸菌的开发利用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(1): 132-135.

Microbial diversity of a community for ensiling rice straw at low temperature and fermentation dynamics

Hongyan Yang^{1,2}, Xufeng Yuan², Xiaoping Liu², Xiaofen Wang², Zongjun Cui^{2*}

¹ College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

² College of Agronomy and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100193, China

Abstract: [**Objective**] To accelerate the conversion of rice straw into feeds in the low-temperature region, a microbial community was constructed by continuous enrichment cultivation. Microbial diversity and dynamics during the fermentation at 10 °C was analyzed. [**Methods**] The community was selected at 5 °C under static condition. To analyze the inoculating effects, the community and commercial inoculant (CI; composed of *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *L. salivarilus*, *Pediococcus acidilactici*) were respectively inoculated into the rice straw for 30 d fermentation at 10°C. Fermented products were detected by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). Composition microorganisms of the community were analyzed using cloning library. Microbial dynamics during the fermentation was detected by denatured gradient gel electrophoresis (DGGE). Quantitative PCR was used for tracking the composition microorganisms of the community during the fermentation. [**Results**] The results from 16S rDNA cloning library showed that the community was mainly composed of *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. At 6d fermentation, the pH and the lactic acid bacterial colony forming units (LAB CFUs) in the fermented rice straw with the community amounted to 4.3 and 2.9×10^9 CFU/g fresh matter (FM), respectively. The pH and LAB CFUs with the CI were respectively 5.3 and 2.9×10^9 CFU/g FM. At 30 d fermentation, the lactic acid concentrations with the community and the CI were respectively 8.1g/kg FM and 2.0g/kg FM. From DGGE patterns, both *L. sakei* and *Leuconostoc inhae* of the community were detected at 6d fermentation and existed during the fermentation. For the treatment with the CI, the uncultured *bacterium* was detected at 6d fermentation besides the composition microorganisms of the CI. At 16d and 30d fermentation, only *L. plantarum* and *E. faecium* were detected. Quantitative PCR showed DNA mass of *L. sakei* amounted to 41.0% at 6d fermentation in the treatment with the community. At 16d, DNA mass of *L. sakei* was 65%. The highest value (5.5%) of DNA mass of *Le inhae* appeared at 6d of fermentation [**Conclusion**] The community could effectively colonize into the rice straw fermentation system and accelerate the fermentation process at low temperature. The dominating microorganism of the community was *L. sakei* at 10°C.

Keywords: rice straw, silage, low temperature, *Lactobacillus sakei*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Department Public Benefit Research Foundation (200803033-B0502), by the National Science & Technology Pillar Program (2007BAD89B07-A) and by the Special Fund from the Central Colleges Basic Scientific Research Operating Expenses

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62731857; E-mail: acuzj@cau.edu.cn

Received : 28 February 2011/ Revised: 9 May 2011