

秸秆发酵中乳酸菌复合系 SFC-2 对杂菌的抑制作用

马静静¹, 王小芬¹, 高丽娟², 杨洪岩¹, 崔宗均^{1*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 生物质工程中心, 北京 100193)

(² 北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘要:【目的】为探明秸秆发酵用乳酸菌复合系 SFC-2 对杂菌的抑制作用。【方法】从秸秆自然发酵体系中, 利用平板划线法、纸片扩散法和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 筛选出 13 株菌作为研究该乳酸菌复合系抑菌作用的对象。【结果】(1) 通过 16S rDNA 序列分析显示 13 株分离菌中 9 株菌的近缘种为 *Enterobacter cloacae*、*Klebsiella oxytoca*、*Bacillus cereus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella terrigena*、*Citrobacter sp.*, 这些均为常见的致病菌或条件致病菌。(2) 将筛选出的致病菌作为被测试菌株, 用 SFC-2 的发酵上清液处理表明: SFC-2 复合系的抑菌作用高于复合系分离的单一菌株和单一菌株人工组合的抑制作用。(3) SFC-2 培养的 14~48 h 内动态检测结果表明: 发酵上清液的有机酸含量有显著差异, 但抑菌活性差异不显著; 发酵上清液经热处理后抑菌活性不发生变化, 蛋白酶 K 处理后抑菌活性部分丧失。

关键词: 乳酸菌; 复合菌系; 抑菌作用; 抑菌机理

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0879-08

我国的畜牧业结构尚属于“精料型”或“耗料型”, 存在着严重的人畜争粮矛盾, 畜牧业未能摆脱对粮食的依赖, 饲料工业受原料短缺的制约, 使饲料成本提高^[1]; 另一方面, 人们对动物产品质量安全的要求也越来越高, 饲料安全同食品安全一起成为百姓关注的热点和焦点问题。针对畜牧业和饲料产业面临的严峻现实, 利用现有的生物质资源研究开发新型安全产品是畜牧业发展的紧迫要求。我国秸秆资源极其丰富, 是重要的生物质资源, 但收获后的秸秆养分低, 质地粗糙, 适口性差, 采用乳酸菌发酵法制作秸秆饲料可提高秸秆适口性和饲用价值, 同时乳酸菌及其代谢产物作为秸秆饲料发酵剂可以防止饲料本身被致病菌污染, 还可防治致病菌对动物肠道的影响^[2], 但是以传统的方式将纯培养微生物接种到未灭菌体系中往往达不到预期的效果^[3]。因此, 笔者实验室利用微生物之间的协同关系, 以自然发酵物为菌源, 通

过长期定向限制性培养筛选出一组含有多株乳酸菌的秸秆发酵用乳酸菌复合系 SFC-2^[4-6]。笔者等以 SFC-2 为研究对象, 研究稳定的复合乳酸菌群体的抑菌作用, 为该复合系的饲料化发酵效果提供理论依据。

国内外对乳酸菌抑菌研究多见一株或几株乳酸菌对致病菌的抑菌作用^[7,8], 测试抑菌活性菌株的选择一般为公认的致病菌和条件致病菌, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[9,10], 尚未见从自然发酵物中筛选出的天然、稳定的乳酸菌复合系协同抑菌作用的报道; Chen 等^[11]指出, 来源于秸秆本源的致病菌或条件致病菌可能更能适应发酵环境而存活, 即某一特定环境中存在的微生物可能对该环境的适应性要高于同样种类的非本源菌, 本源菌抗逆境的生存能力强, 因此对于秸秆发酵用菌系抑菌效果的研究,

基金项目: 国家自然科学基金(305710588)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-62731857; E-mail: acuizj@cau.edu.cn

作者简介: 马静静(1977-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 主要研究方向为生物质资源综合利用及微生物生态学。E-mail: majingjing0416@126.com

收稿日期: 2007-11-26; 修回日期: 2008-04-15

采用秸秆发酵体系中存在的致病菌作为抑菌活性的测试菌株更有意义,基于此本试验从自然发酵的秸秆中筛选出杂菌,利用分子生态学技术和传统的平板分离手段探明来自发酵秸秆本源的致病菌分类地位,研究秸秆发酵用乳酸菌复合系 SFC-2 对那些杂菌的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 乳酸菌: 秸秆发酵用乳酸菌复合系 SFC-2 为本实验室筛选保存,主要由植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 和类干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 组成^[4,6]。本实验采用了乳酸菌复合系 SFC-2 及由该复合系中分离的发酵乳杆菌、植物乳杆菌和类干酪乳杆菌单菌株。向 GenBank 提交其 3 菌株的 16S rDNA 序列登录号依次为 DQ399350, DQ399351, DQ399353。

1.1.2 测试菌: 抑菌活性的测试菌株为本次试验从自然发酵的稻草秸秆中分离筛选获得的致病菌和条件致病菌。

1.1.3 发酵材料: 河北省万全县郭磊庄收获后风干的水稻秸秆。试验材料基本组分见表 1

表 1 试验材料化学组成和材料上附着的一般细菌数
Table 1 Chemical composition and epiphytic bacterial cell count of rice straw

Moisture /%	Crude protein /%	Crude fiber /%	Crude lipids /%	Water-soluble carbohydrate /%	Epiphytic bacterial cell count CFU/g
5.26	6.77	26.06	0.38	7.70	2.7×10^7

1.1.4 培养基和主要试剂、仪器: 乳酸菌培养用 MRS-S 培养基^[12]、测试菌筛选和培养用牛肉膏蛋白胨培养基^[13]。TIAN GEN 公司产的 Taq 酶及普通 DNA 产物纯化试剂盒、Toyobo 公司生产的 RNA 酶、AMRESCO 公司生产的 Proteinase K、Molecular Probes 生产的 SYBR GREENI、日本 HORIBA 公司产 B2212 型 Compact pH meter、日本岛津公司产 QP25050 型气质联用机(GC—MS)、美国 Bio-Rad 公司生产的 DCode 突变检测系统、日本岛津公司产 BioSpec-miniDNA/RNA/PROTEIN Analyzer、江苏荣华产 SHZ—82A 气浴恒温振荡器、美国 Alpha Innotech 公司产 AlphaEase FC Imaging System。

1.1.5 SFC-2 发酵上清液: 保存的 SFC-2 菌种活化两代后,以 2% (V/V) 接种量接到灭菌的 MRS-S 培

养液中,30 静止培养不同时间,然后在 10700×g 条件下离心 20 min,取上清,经细菌过滤器过滤(滤膜孔径为 0.22 μm),收集滤液即为不含菌的发酵上清液,放-20 冰箱备用。

1.2 乳酸菌发酵上清液抑菌活性测定

1.2.1 纸片扩散法: 将活化后的测试菌接种到牛肉膏蛋白胨培养液,30 培养 20 h。将菌液 OD_{600} 用培养液调整为 0.8,菌数约为 1×10^8 CFU/mL,取 200 μL 接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基平板,涂布均匀,固定 1 h 后,放入灭菌滤纸圆片(滤纸圆片直径为 5.5 mm)。取置备好的发酵上清液 10 μL 滴加到滤纸圆片上,以灭菌的 MRS-S 培养液为空白对照(无菌操作),处理和空白均做 3 个重复。平板置于 30 培养 24 h,测量抑菌圈直径,抑菌圈直径 > 7.0 mm 有抑菌活性。

1.2.2 生长量测定法: 在 100 mL 的三角瓶中加入 30 mL 牛肉膏蛋白胨培养液,湿热灭菌后,在无菌操作下加入乳酸菌发酵上清液 4.5 mL(蛋白酶 K 预处理的加 2.0 mL),并接种测试菌菌液 2% (1×10^8 CFU/mL, V/V),以只接种测试菌不加乳酸菌发酵上清液的作为对照(control),放在气浴恒温振荡器上 190~195 r/min,30 摇瓶培养,在不同时间取样测不同处理的 OD_{600} 和 pH。 OD_{600} 的测定仪器为 BioSpec-mini DNA/RNA/PROTEIN Analyzer (Shimadzu, Japan),具体操作是将灭菌的牛肉膏蛋白胨培养液作为空白倾倒入测生长量专用比色杯中,选用 600 nm 波长调零,然后对培养不同时间的菌液从 0 h 起依次进行测定,对浓度大的菌悬液用培养液适当稀释后测定,然后将测出的值乘以稀释倍数即为实际值。pH 用 Compact pH meter 测定^[13]。

1.3 乳酸菌代谢产物的测定

取乳酸菌培养液 5 mL,10700×g 离心 20 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜后,用气质联机分析。测定条件:分析柱: CP—Chirasil—Dex CB(25 m×0.25 mm)毛细管柱;柱箱升温程序:50 保持 1 min,然后以 7 /min 升温到 100 保持 1 min,再以 17 /min 升温至 195 保持 3 min,共 17.5 min;进样口温度 190 ;检测器温度 230 ;载气为氦气(75 kPa);流量 36 mL/min ;分流比 1/20;检测器电压 0.7 kV;进样量 1 μL。对测定数据,利用 NIST 数据库检索进行定性分析。再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 测试菌株的筛选与鉴定

从自然发酵的水稻秸秆中筛选测试菌, 筛选指标: 菌源为自然发酵的秸秆体系; SFC-2 复合系对其有明显的抑制作用; 对发酵饲料的品质和饲用安全性起不利或消极作用。具体方法是将秸秆粉碎成 1~2 cm 长, 加蒸馏水至最终含水量为 70%, 填充于 100 mL 的螺口瓶, 装瓶封口后置于 30 °C 恒温下自然发酵。在开始发酵的 2 d, 5 d, 7 d, 15 d, 20 d, 26 d 开口取样, 用牛肉膏蛋白胨培养基平板划线分离法筛选发酵过程中的细菌, 采用充氮气和充氮气培养两种方式。分离纯化后的细菌用纸片扩散法进行抑菌试验, 筛选出 SFC-2 乳酸菌复合系对其抑制作用明显的单菌, 将二次筛选获得的细菌采用 DCode 突变检测系统 (Bio—Rad, Laboratories, Hercules, Calif) 对 16S rDNA V3 区域的 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析, DGGE 分析方法参照文献[14, 15]进行。剔除 DGGE 图谱中条带位置一致的单菌, 再将条带位置不同的菌进行 16SrDNA 全长 PCR, PCR 产物经 TIANGEN 公司产的 PCR 产物纯化试剂盒去掉引物后, 送测序公司测序。根据 16SrDNA 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: 将分离菌株及其在 GenBank 中相近的模式菌的 16SrDNA 基因序列一并调入 MEGA(version 2.1) 软件^[16] 中做进化分析, 使用 CLUSTAL_X(version 1.81) 软件包进行多序列比对, 构建 Neighbor-Joining (N-J) 系统发育树。最后根据平板分离的菌落特征、分离菌代谢产物、抑菌筛选试验和数据库分析结果确定测试菌。测试菌的序列提交 GenBank 注册, 获得登录号为 EF633995-EF634000、EU365679-EU365685。

1.5 SFC-2 复合系、其平板分离单菌株及单菌人工组合的抑菌能力比较

SFC-2、SFC-2 组成单菌、单菌人工组合 (分离单菌株菌液等体积组合) 的发酵上清液和筛选出的编号为 M-1、M-2 的两株测试菌做抑菌实验, 采用生长量测定法测定不同处理的抑菌能力, 并测定不同处理的有机酸含量。

1.6 不同培养时间的 SFC-2 复合系发酵上清液抑菌活性

将活化的 SFC-2 菌种以 2% (V/V) 接种量接到灭菌的 MRS-S 液体培养基中, 30 °C 静止培养 14 h、24 h、30 h、36 h、42 h、48 h, 测定 pH、生长曲线 (OD) 和有机酸含量, 并制备发酵上清液, 采用纸

片扩散法和生长量测定法, 以 M-1 为测试菌测定不同发酵时间的抑菌活性。

1.7 SFC-2 复合系发酵上清液抑菌活性的热稳定性试验

将 SFC-2 复合系发酵上清液分别用 50 °C、80 °C、100 °C 水浴处理 15 min 后, 采用生长量测定法, 以 M-1、M-2 为测试菌做抑菌实验, 研究抑菌物质的热稳定性。

1.8 蛋白酶 K 预处理对 SFC-2 发酵上清液抑菌活性的影响

取两份 SFC-2 上清液分别加入蛋白酶 K 至酶浓度为 1 mg/mL 和 2 mg/mL, 在 37 °C 水浴中孵育 2 h 后采用生长量测定法, 以 M-1 为测试菌进行抑菌活性的测定。

2 结果和分析

2.1 测试菌的筛选

通过平板稀释法从自然发酵的秸秆体系中分离纯化得到 63 株单菌: 发酵的第 2 天获得 31 株单菌、第 5 天获得 11 株单菌、第 7 天获得 12 株单菌、第 20 天获得 9 株单菌; 利用抑菌试验中的纸片扩散法进行二次筛选, 获得 26 株能被 SFC-2 发酵上清液明显抑制的菌株 (抑菌圈直径 > 8 mm); 将二次筛选获得的 26 株平板分离单菌进行 DGGE 3 次筛选获得 DGGE 图谱上条带位置不一样的 13 株分离菌, 其中 10 株是在发酵的第 2 天筛选获得、1 株是在发酵第 5 天筛选获得、2 株是在发酵第 20 天筛选获得, 由此可知, 在秸秆自然发酵体系中能被 SFC-2 复合系抑制的菌主要是在发酵的初期。以这 13 株分离菌 DNA 做模板, 进行 16S rDNA 全长 PCR, PCR 产物去引物后送测序公司测序, 序列测定后, 进行数据库检索, 构建 N-J 系统发育树 (发育树图略)。从自然发酵的秸秆体系最终获得 13 株分离菌 16S rDNA 全序列, 其中有 9 株分离菌经 NCBI 数据库检索, 其近缘种是 *Enterobacter cloacae*、*Klebsiella oxytoca*、*Bacillus cereus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella terrigena*、*Citrobacter* sp. (表 2), 这 9 株分离菌的近缘种 7 株均属于肠杆菌科、2 株属于 *Bacillus cereus*, 都是常见的致病菌或条件致病菌^[17]。表明在秸秆自然发酵过程中, 能被 SFC-2 抑制的平板分离菌中, 致病菌和条件致病菌占 69% 还多, 且这些杂菌主要存在于发酵初期。最终结合平板分离的菌落特征、数据库检索结果, 确定了 6 株分离菌 (M-1 至 M-6) 作为本次试验的测试菌株。

表 2 13 株分离菌株 16S rDNA 测序分析结果
Table 2 16S rDNA sequencing results of isolated 13 bacterias

Name	Closest relative (Accession number)	Identity/%	Accession number
M-1	<i>Bacillus cereus</i> strain B332 (DQ523499)	100	EF633995
M-2	<i>Klebsiella oxytoca</i> (AB053117)	99	EF633996
M-3	<i>Enterobacter cloacae</i> strain (DQ202394)	99	EF633997
M-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AY369139)	99	EF633998
M-5	<i>Citrobacter freundii</i> (AF025365)	98	EF633999
M-6	<i>Klebsiella terrigena</i> (Y17658)	98	EF634000
M-7	<i>Bacillus cereus</i> strain AU50 (EF032682)	99	EU365680
M-8	<i>Citrobacter freundii</i> (AB210978)	97	EU365679
M-9	<i>Citrobacter</i> sp. AzoR-4 (DQ279751)	93	EU365681
M-10	<i>Massilia timonae</i> (AM237367)	97	EU365682
M-11	<i>Bacillus subtilis</i> strain (DQ012095)	100	EU365683
M-12	<i>Bacillus</i> sp. V4.B (AJ244686)	99	EU365684
M-13	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> (DQ363432)	99	EU365685

2.2 SFC-2 复合系、其分离单一菌株及单一菌株人工组合的抑菌能力及有机酸含量分析

2.2.1 SFC-2 复合系、其分离单一菌株及单一菌株人工组合的抑菌能力比较：用 SFC-2 复合系，其分离单一菌株及单菌的人工组合发酵上清液进行抑菌试验表明，8 个处理对测试菌 M-1、M-2 均表现出不同程度的抑菌活性。SFC-2 复合系的发酵上清液在 72 h 内对测试菌 M-1、M-2 的抑制率是 100%，如图 1 示；分离单一菌株 *Lactobacillus fermentum* 的发酵上清液和测试菌混合培养，发酵上清液对测试菌的生长在 20 h 内为抑制作用，而 20 h 后为促进作用；抑菌能力最好的是 SFC-2 复合系发酵上清液，抑菌作用最低的是 *Lactobacillus fermentum* 发酵上清液，复合系的抑菌作用高于复合系中分离菌及分离菌人工组合的。连续混合培养 72 h，8 个处理对测试菌 M-1、M-2 的抑制作用大小顺序是一致的，依次是 SFC-2> *Lactobacillus(L) plantarum*>*L. plantarum*+*L. fermentum*> *L. plantarum* +

L.paracasei > *L. plantarum*+*L. fermentum*+ *L.paracasei*> *L. fermentum*+ *L.paracasei*> *L.paracasei*> *L. fermentum*。

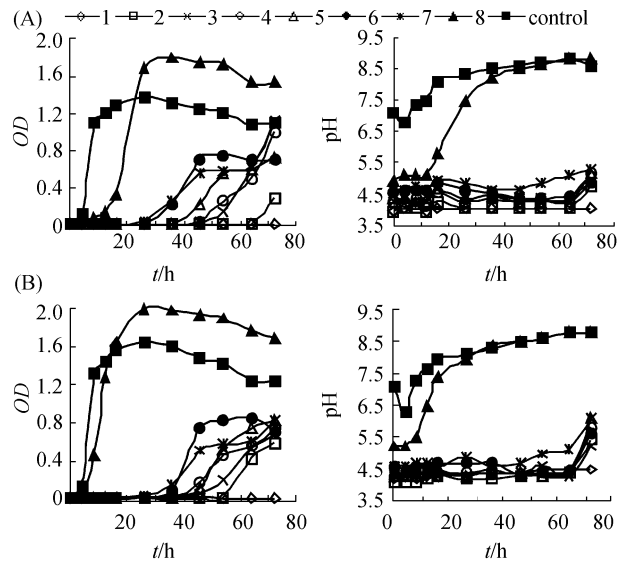


图 1 乳酸菌复合系、复合系组成单菌和单菌人工组合发酵上清液与测试菌 M-1(A)和 M-2(B)混合培养的生长特性
Fig. 1 Mixed cultures of LAB (lactic acid bacteria) cell-free supernatant and indicating bacteria. 1. SFC-2 community; 2. *Lactobacillus(L) plantarum*; 3. *L.plantarum*+*L.fermentum*; 4. *L.plantarum*+*L.paracasei*; 5.*L.plantarum*+*L.fermentum*+ *L.paracasei*; 6. *L.fermentum*+*L.paracasei*; 7. *L.paracasei*; 8. *L.fermentum*.; control. M-1(A), M-2(B) of no add LAB cell-free supenatant.

2.2.2 SFC-2 复合系、其分离单一菌株及单菌株人工组合的发酵液有机酸含量分析

：处理 1 到 8 对 M-1，M-2 的抑菌作用逐渐降低(图 1)；处理 1 到 8 有机酸含量(AA+LA)总趋势是逐渐减少(图 2)，但乳酸(LA)、乙酸(AA)总量并不和抑菌作用顺序一致，

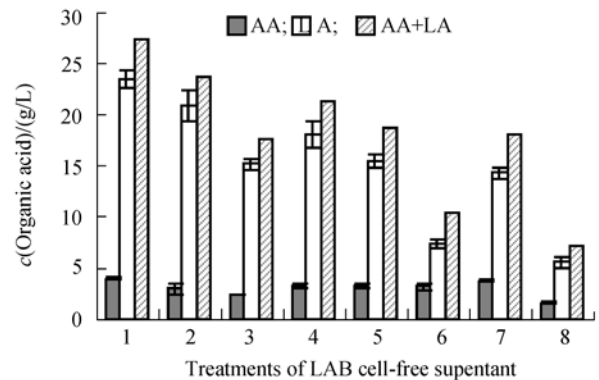


图 2 SFC-2、复合系组成单菌和单菌人工组合发酵上清液中有有机酸含量

Fig. 2 Organic acid content of LAB cell-free supenatant. Treatment: 1. SFC-2 community; 2. *Lactobacillus(L) plantarum*; 3. *L.plantarum*+*L.fermentum*; 4. *L.plantarum*+*L.paracasei*; 5. *L.plantarum*+*L.fermentum*+*L.paracasei*; 6. *L.fermentum*+ *L.paracasei*; 7. *L.paracasei*; 8. *L.fermentum*.

处理 3 有机酸含量低于处理 4、5、7 的,但处理 3 的抑菌作用大于处理 4、5、7 的,同样处理 6 有机酸含量低于处理 7,但处理 6 的抑菌作用大于处理 7。由此可知,乳酸菌在发酵过程中产生有机酸,从而降低体系的 pH 是抑制发酵体系中杂菌的一个重要因素,但有机酸不是唯一的抑菌作用因素。

表 3 乳酸菌发酵上清液热处理后和测试菌混合培养第 72 h 的抑菌作用

Table 3 Inhibitory effects of the LAB cell-free culture supernatant pretreated by heating on indicating bacteria

Pretreated temperature/	Ratio of inhibition/% ^a					
	SFC-2 community		L.plantarum		<i>L.plantarum</i> + <i>L.fermentum</i> + <i>L.paracaei</i>	
	M-1	M-2	M-1	M-2	M-1	M-2
Untreated	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00	54.81 ± 0.87	66.27 ± 0.53	38.99 ± 0.66	32.63 ± 0.64
50	100 ± 0.00	100 ± 0.00	54.46 ± 0.74	66.79 ± 0.52	37.51 ± 0.55	31.45 ± 0.77
80	100 ± 0.00	100 ± 0.00	50.58 ± 0.86	64.22 ± 0.78	37.54 ± 1.16	30.98 ± 0.44
100	100 ± 0.00	100 ± 0.00	51.80 ± 0.19	65.28 ± 0.50	38.99 ± 0.91	30.14 ± 0.83

^a:inhibition rate(IR)=(OD_{600} control - OD_{600} treatment) / OD_{600} control × 100%; ^b IR values indicate means ± SD(n=3)

2.4 不同培养时间的 SFC-2 复合系发酵上清液抑菌作用

采用纸片扩散法和液体培养生长量测定法测定了 SFC-2 发酵上清液在连续培养 48 h 中的抑菌活性动态。结果,从 14 h 到 48 h 的培养过程中,SFC-2 对 M-1、M-2 的抑菌作用没有变化(图 3)。随着发酵时间的延长,在 30 h 之前,有机酸的积累是逐渐增加的,在 30 h 有机酸积累达到最高:27.426 g/L,30 h 后有机酸积累减少,但上清液的抑菌活性不随有机酸浓度增加而增加;采用生长量测定法测定 SFC-2 对

2.3 热处理对乳酸菌发酵上清液抑菌作用的影响

SFC-2、*L. plantarum*、*L.pl+L.fer+L.pa* 发酵上清液经 50、80、100 水浴处理 15 min 后对 M-1、M-2 的抑菌活性与未热处理的相比,连续培养 72 h 内没有显著差异($P>0.05$) (表 3)。测试菌的生长曲线如图 1 所示,这表明上清液中的抑菌活性物质有热稳定性因子存在。

M-1、M-2 发酵过程中抑菌作用动态,结果表明,在 72 h 内复合系的发酵上清液对测试菌都是完全抑制,抑制率是 100% (数据略),和纸片扩散法测定结果一致。

2.5 SFC-2 发酵上清液用蛋白酶 K 预处理后的抑菌作用

SFC-2 发酵上清液经蛋白酶 K 预处理后对 M-1 的抑菌作用降低,但抑菌活性没有完全消失(图 4)不同酶浓度处理后对 M-1 的抑菌作用差异不显著($P>0.05$),这表明 SFC-2 上清液的抑菌物质中有对蛋白酶敏感的成分。除了对蛋白酶敏感的成分,还有其它抑菌物质存在。

3 讨论

复合系 SFC-2 是通过连续的限制性培养在秸秆发酵体系中筛选到的一组秸秆接种菌系,SFC-2 接种到未灭菌的稻秆后,其中的主要菌株很快成为发酵体系的优势菌,对不利于保持饲料营养和品质的杂菌有明显的抑制作用^[5]。研究 SFC-2 对杂菌的抑制作用机理首先要确定抑菌活性的测试菌株,一些公认的致病菌和条件致病菌,如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是常用的测试抑菌活性的菌株,但为了研究 SFC-2 对秸秆发酵体系中杂菌的抑制作用,就有必要清楚秸秆发酵体系中存在哪些杂菌? SFC-2 能否抑制秸秆发酵体系中影响饲料品质的致病菌? 因此以存在于秸秆发酵体系中的致病菌作为测试 SFC-2 抑

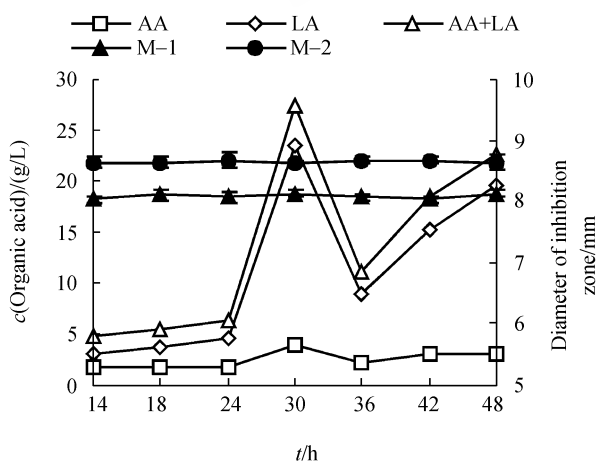


图 3 SFC-2 复合系在 MRS-S 培养液中有有机酸及抑菌作用动态变化

Fig. 3 The dynamic changes in organic acid production and antibacterial activity of the SFC-2 community cultivated in MRS-S broth.

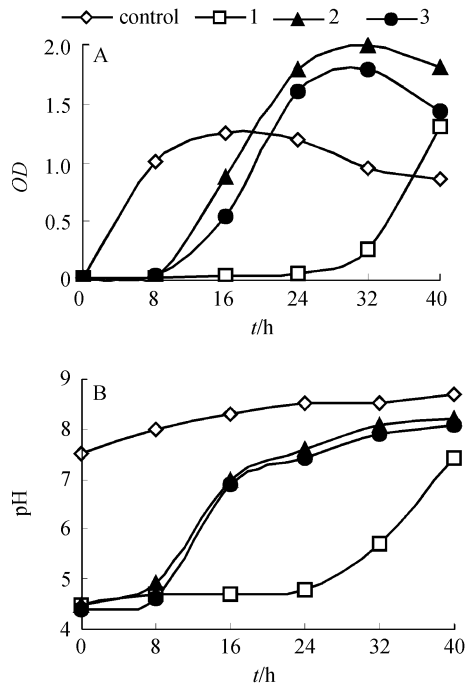


图4 蛋白酶K预处理的SFC-2发酵上清液和M-1混合培养的生长特性, A. OD; B. pH

Fig. 4 Inhibitory effects of the LAB cell-free supernatant pretreated by Proteinase K on indicating bacteria. Control. M-1 of no add LAB cell-free supernatant; 1. untreated cell-free supernatant; 2. concentration of Proteinase K pretreatment: 1mg/mL; 3. concentration of Proteinase K pretreatment: 2 mg/mL.

菌活性的菌株更有研究意义,本研究从自然发酵的秸秆体系获得13株能被SFC-2上清液抑制的分离菌株,经测序,有9株菌是常见的致病菌和条件致病菌^[17],采用本试验的筛选方法,秸秆发酵体系中能被SFC-2抑制的分离菌中,致病菌的筛出率达到了69%还多。将筛选于秸秆本源的致病菌作为秸秆发酵添加菌剂抑菌活性的测试菌株尚未见有文献报道。

在长期的试验和生产实践中,人们发现很多生物过程必须依靠两种或两种以上的微生物来完成。笔者实验室筛选的秸秆发酵用乳酸菌复合系SFC-2和苜蓿青贮用乳酸菌复合系A12接种效果都优于复合系中单菌人工组合处理^[6,18],本研究中,SFC-2复合系的抑菌作用优于组成复合系的单菌和单菌的人工组合处理,均表现出了复合系的优越性。组成、功能稳定的菌系各成员菌的协同作用可能是该菌系接种效果和抑制杂菌作用明显优于组成复合系单菌和单菌人工组合处理的原因。

乳酸菌的抑菌机制涉及多种抑菌成分。乳酸菌的代谢产物包括有机酸、细菌素、乙醇等,其中有机酸和细菌素的抑菌作用是乳酸菌抑菌机制中研究的最

多的方面^[17,19]: Alakomi^[21]认为益生乳酸菌对致病菌的抑菌机制是期于有机酸和非乳酸分子的协同作用,有机酸的作用是对致病菌的外细胞膜进行了透化处理,增加了致病菌细胞对拮抗物质的敏感性或易感性,从而使抑菌物质穿透细胞;一些产细菌素的乳酸菌在发酵过程中产生细菌素,细菌素是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌活性的小的、热稳定的肽^[21]。在本次试验中,SFC-2发酵上清液、SFC-2组成单菌、单菌人工组合发酵上清液的抑菌作用大小与其上清液中有机酸含量不完全一致(图1);不同培养时间的SFC-2发酵上清液对本试验的测试菌株抑菌作用是一致的,而在培养不同阶段,SFC-2产有机酸的量有显著差异($P < 0.01$),培养14h的上清液中有机酸含量为4.728 g/L、而培养30h的上清液中有机酸含量为27.426 g/L(图3),结果证明有机酸不是SFC-2抑菌的唯一成分,除了有机酸起抑菌作用外,还有其它抑菌因素存在;选择抑菌作用强的三个处理SFC-2、*L. plantarum*、*L. plantarum*+*L. fermentum*+*L. paracaei*的发酵上清液经50、80、100水浴处理15min后对M-1、M-2的抑菌活性不变,说明抑菌活性物质为热稳定性物质,SFC-2发酵上清液经蛋白酶K处理后的抑菌活性部分丧失,说明抑菌活性物质中有对蛋白酶敏感的组分,而细菌素是对蛋白酶敏感、热稳定的多肽物质^[8,21]。其抑菌机理有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 郭庭双. 秸秆畜牧业. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 1996, 1-14.
- [2] 杨洁彬, 凌代文, 郭心华, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用, 第一版. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, 187-201.
- [3] 冯树, 张忠泽. 混合菌-一类值得重视的微生物资源. 世界科技研究与发展(WORLD SCI-TECH R&D), 2001, 22(3): 44-47.
- [4] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 等. 秸秆发酵乳酸菌复合系SFC-2的构建及组成多样性. 环境科学(ENVIRONMENTAL SCIENCE), 2007, 28(5): 148-154.
- [5] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 等. 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): 227-231.
- [6] Gao LJ, Yang HY, Wang XF, et al. Rice straw fermentation using

- lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* 2008, 99 (8): 2742–2748.
- [7] Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98 (10): 662–666.
- [8] Rodriguez E, Arques JL, Nunez M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7): 3399–3404.
- [9] Xue J, Hunter I, Steinmetz T, et al. Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl. Environ. Microbiol*, 2005, 71(3): 1283–1290.
- [10] Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, et al. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, 24(1): 85–106.
- [11] Chen Y, Sela S, Gamburg G, et al. Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (9): 5163–5170.
- [12] De Man J, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1972, 23, 130–135.
- [13] Yang HY, Gao LJ, Wang XF, et al. Effects of cultivation conditions on the diversity of microbes involved in the conversion of rice straw to fodder. *Journal of Environmental Sciences*. 2007, 19(01): 315–321.
- [14] 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.
- [15] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解. 中国农业大学学报(*Journal of China Agricultural University*), 2006, 11(5): 1 7.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244–1245.
- [17] Alain LS. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004, 28 (1): 405–440.
- [18] Wang XF, Haruta S, Cui ZJ, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2006, 57(1): 106–115.
- [19] Messaoudi DF, Berger CN, Polter MHC, et al. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid- Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 6008–6013.
- [20] Alakomi HL, Skytta E, Aarela M, et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (5): 2001–2005.
- [21] Cotter PD, Hill C, Paul RR. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (10): 777–778.

Antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 used for fermentation of air-dried crop straws

Jingjing Ma¹, Xiaofen Wang¹, Lijuan Gao², Zongjun Cui^{1*}

¹Center of Biomass Engineering, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

²Center of Beijing Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 in fermented crop straw. **[Methods]** Total 13 isolates were obtained from spontaneous fermented rice straw by plating, paper diffusion and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. All these strains were used to determine the antibacterial activity of SFC-2.

Supported by the National Science Foundation of China (30571426)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-82898590; E-mail: rcyu@ms.qdio.ac.cn

Received: 29 November 2007/ Revised: 24 March 2008

[Results] (1) Phylogenetic analysis of the 13 strains based on 16S rDNA gene sequence data indicated that 9 strains belong to *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella terrigena* and *Citrobacter* sp., which were all common pathogens or opportunistic pathogens. (2) Indicating bacteria selected from the pathogens were used to detect antibacterial activity of SFC-2 cell-free culture supernatant. The results showed that: SFC-2 community had stronger antibacterial activity than isolated strains from SFC-2 community or man-made communities against indicating bacteria. (3) Antibacterial activities of seven different cell-free culture supernatants, which were extracted at intervals from the culture of SFC-2 community during 14-48 hours, were no obvious difference, but the content of organic acids were obvious differences during 14-48 hours; the antibacterial substances were stable after heating and sensitive partly to protease K.

Keywords: Lactic acid bacteria; community; inhibitory effects; inhibitory mechanism

爱心馒头进灾区，别样风景暖灾民

——安琪酵母公司江油“天使行动”侧记

四川江油——这座伟大诗人李白故里，昔日美丽如画的县城，如今却因汶川特大地震变的满目疮痍。偌大一座县城，很多居民至今不敢住在家中，满街帐篷林立。这里，也是北川县地震安置群众的重要集居地，目前驻扎了各地受灾民众 4000 余人。安琪酵母股份有限公司命名为“天使行动”的救灾计划已经在宜昌总部和灾区展开，到目前为止，已经捐赠和救灾支出共 140 多万元。

5月22日，一支来自湖北宜昌安琪酵母公司组织的特殊队伍，他们就是“安琪酵母*天使行动小组”，这一支由10余名安琪高级面点师组成的队伍接到公司指令后从中国各地飞抵成都后立即转赴四川江油。此前，他们正在各地开展面点技术服务工作。汶川大地震后，当安琪酵母股份有限公司发出“为受灾群众现场制作爱心馒头”号召时，他们争先报名，直奔灾区一线！他们要在这里为灾区群众，义务做馒头15天。

没有宾馆，他们自带着帐篷和受灾群众住在一起；没有制作设备，他们从成都租车运送；没有原材料，他们提着袋子四处找寻……

繁琐的准备工作让大家忙碌了整整两天时间。23日晚，当地余震不断，所有人都提心吊胆，可一想到受灾民众马上就能吃上热乎乎的馒头，大家顿时心里便充满了无穷的力量！

5月24日一大早，队员们便早早起床，开始了一天紧张工作：清洗物品、提水、烧水、活面、压面、做馒头……尽管是义务赠送，大家都不敢有丝毫马虎，严格按照规程操作，所有人必须站着工作，必须穿着统一的安琪面点师服、戴着帽子、戴着口罩开展工作。天气炎热，他们很想打开口罩、丢掉帽子来揉面，但想到必须做出卫生的食品给大家，大伙一点怨言都没有，坚持到最后！

当地政府给受灾群众的安置工作做非常辛苦，由于人太多，食品暂时只能是供应一些干粮和部分自发的社会团体提供的饭菜。正是为了让灾区能吃上热乎、可口的食品，安琪公司才决定组织专业面点师抵灾区义务奉献“安琪爱心馒头”。



(下接第 892 页)