

# 乳酸菌复合系 SFC-2 处理水稻秸秆的效果

高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 吕育财, 崔宗均\*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

**摘要:**以处理农作物秸秆,减轻环境压力为目的,将本实验室筛选的乳酸菌复合系 SFC-2 接种到水稻秸秆,研究了其饲料化效果.结果表明,接种处理与未接种处理相比外观上颜色发黄发亮,松软酸香,发酵 30 d 后,接种处理的 pH 降至 3.8,对照为 4.1.同时发酵料中乳酸生成量增加,尤其是 L-乳酸增加了约 2 倍,粗蛋白含量提高了 10.16%,粗纤维含量降低了 3.2%.通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析发酵过程中微生物菌系变化,接种 SFC-2 后,复合系中的主要组成菌 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* 和 *Lactobacillus paracasei* 等菌株迅速成为发酵料中的优势菌群,相应未接种对照中可见的 *Enterobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter endosymbiont*, *Pantoea ananatis* 等杂菌被抑制,发酵品质得到明显改善.

**关键词:** 秸秆发酵;复合系;变性梯度凝胶电泳

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)06-1392-05

## Effects of a Lactic Acid Bacteria Community SFC-2 Treated on Rice Straw

GAO Li-juan, WANG Xiao-fen, YANG Hong-yan, GAO Xiu-zhi, LÜ Yu-cai, CUI Zong-jun

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

**Abstract:** Aimed to utilize rice straw and lessen the pressure of environment, the rice straw was used as the fermentation material, and a lactic acid bacteria community SFC-2 from my laboratory was inoculated into the rice straw to investigate the inoculation effects. After 30 days fermentation, the inoculated fermented straw smelt acid-fragrant, and the pH value was 3.8, which was lower than the control of 4.1. Furthermore, lactic acid concentration was more than that in the control. Especially L-lactic acid concentration was two times more than in the control, and the crude protein content was 10.16% higher than that in the control, and the crude fiber content was 3.2% lower than that in the control. From the patterns of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus paracasei* rapidly became the advantageous species in the inoculated straws. However, *Enterobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter endosymbiont*, *Pantoea ananatis*, which were predominate in the controls, were not detected in the inoculated straws, and the fermented quality was improved significantly.

**Key words:** rice straw fermentation; community; DGGE

近几年由于农作物产量的大幅度提高和农民薪材结构的改变,剩余大量的秸秆.在夏、秋 2 季作物收获期间,频频出现的大面积焚烧秸秆对环境的影响已引起人们的广泛关注<sup>[1,2]</sup>.农作物秸秆中含有氮、磷、钾、碳氢元素及有机硫等,经不完全燃烧会产生大量的氮氧化物、二氧化硫、碳氢化合物及烟尘,造成了严重的大气污染.燃烧秸秆形成大量的烟雾,使空气能见度大大降低,成都机场和石家庄机场几乎年年都要被迫关闭,每年造成数百万元的经济损失<sup>[2]</sup>.另外焚烧秸秆也是对资源的浪费,我国每年约产生  $6.5 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8$  t 农作物秸秆<sup>[3]</sup>.秸秆是重要的生物质资源,其蛋白质含量约 5%,纤维素含量约 30%,还含有一定量的钙、磷等矿物质<sup>[4]</sup>.因此,解决我国剩余秸秆问题不仅对治理环境污染极其重要,也对资源有效利用、促进我国经济的可持续发展具有重要意义.

解决剩余秸秆有开发能源、有机肥、秸秆饲料等多条途径.其中,秸秆转化为反刍动物的饲料是解决

秸秆污染问题,同时获得肉蛋白营养来源的重要途径.我国的畜牧业正朝着“节粮型”结构调整,农业部制定的未来 10 a 全国秸秆养畜过腹还田项目的发展目标是:到 2010 年我国的秸秆饲用率要达到 55%<sup>[3]</sup>.但刚收获后的秸秆养分低,质地粗糙,适口性差,因而如何提高秸秆的适口性,提高饲用价值是解决我国秸秆公害、提高秸秆利用率的一大热点.通过微生物发酵是提高秸秆适口性和饲用价值的重要途径之一.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<sup>[5]</sup>,因此,笔者利用微生物之间的协同关系构建了乳酸产量大、组成和功能稳定的乳酸菌复合系 SFC-2<sup>[6]</sup>.本实验研究了 SFC-2 接种到水稻干秸秆后发酵物饲料化的效果,以及接种后发酵物中微生物群落的动态.

收稿日期: 2006-08-30; 修订日期: 2006-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571088)

作者简介: 高丽娟(1978~),女,博士研究生,主要研究方向为生物质资源利用及微生物生态, E-mail: aglj889@sohu.com

\* 通讯联系人, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌种及其培养:菌种选用本实验室从秸秆发酵饲料中筛选的乳酸菌复合系 SFC-2<sup>[6]</sup>,主要由植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和类干酪乳杆菌(*L. paracasei*)组成.用 MRS-S 培养液(1 L 中蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母粉 5 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g,柠檬酸二铵 2 g,乙酸钠 5 g,蔗糖 20 g,吐温 80 1 mL,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.58 g,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.25 g,pH 调至 6.2~6.4,115 ℃ 灭菌 20 min)厌氧静置培养 24 h 后供接种.

水稻秸秆:来自河北省万全县郭磊庄镇 2004 年秋收获、脱粒后的干稻秆.

1.2 试验设计

将风干的稻秆粉碎成 1~2 cm 长,加纯水至含水量 70%(质量浓度),用 MRS-S 培养液培养 24 h 的乳酸菌复合菌系 SFC-2 按 1×10<sup>6</sup> CFU/g(湿重)喷洒,均匀搅拌,装满于 100 mL 的螺口瓶密封,30 ℃ 培养.以加等量培养基的处理为对照,各 15 次重复,分别于发酵开始后第 2、7、10、15 和 30 d 各取 3 次重复测定以下项目.

1.3 外观品质及 pH 测定

打开发酵瓶盖,记录色泽、手感和气味.再从发酵瓶中部取发酵料 0.5 g 置于 4.5 mL 无菌水中,振荡后静置 20 min,取汁液 0.2 mL 滴于 HORIBA 微量 pH 计(model B-212, HORIBA, Japan)测定.

1.4 化学成分测定

经 60 ℃、48 h 烘干后粉碎,过 40 目筛,可溶性糖(water-soluble carbohydrates, WSC)的测定采用恩酮比色法<sup>[7]</sup>,粗蛋白的测定用凯氏定氮法,粗纤维的测定用酸碱洗涤法,粗脂肪的测定用索氏提取法,具体方法均按文献[8]所介绍的步骤进行.

1.5 挥发性发酵产物测定

取发酵料 1 g,加 2 mL 纯水,充分振荡静置后挤汁液过 0.22 μm 滤膜,用气质色谱(GC-MS, model QP.5050, Shimadzu, Japan)测定其组分.分析柱:CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱(25 m×0.25 mm);柱箱温度程序:50 ℃ 2 min 后以 5 ℃/min 速度升至 100 ℃,再以 15 ℃/min 速度升至 190 ℃,保持 2 min,共 18 min;汽化温度:190 ℃;检测器温度:230 ℃;检测器电压:1.5 kV;载气:氦气(64 kPa);流量:30 mL/min;进样器为分流,分流比 1/22,进样量为 1 μL.

1.6 活菌计数

乳酸菌计数选用 MRS 培养基;复合菌系 SFC-2 的培养用 MRS-S 培养液(其中的葡萄糖改为蔗糖),一般细菌计数选用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂 15 g,蒸馏水定容到 1 L,pH 7.4~7.6,121 ℃ 灭菌 15 min);酵母计数选用 PDA 培养基(葡萄糖 20.0 g,马铃薯块 200~300 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水定容 1 L,pH 5.5~5.7,115 ℃ 灭菌 20 min).用稀释平板法涂于各种培养基后,乳酸菌培养基置于密封容器中充氮气厌氧培养,其他 2 种培养基置于好氧中,均于 30 ℃ 静置培养.

1.7 DNA 的提取

DNA 的提取采用苯酚-氯仿抽提法<sup>[9]</sup>.

1.8 PCR-DGGE 及 DGGE 条带序列分析

PCR: 选用引物 357F-GC (GC clamp-5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3',其中 GC-clamp 序列为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCACG GGGGG-3')和 517R(5'-GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG-3')<sup>[10]</sup>来扩增细菌 16S rDNA V3 区域,供 DGGE 分析.PCR 反应体系为(50 μL):模板 DNA 10 ng, 10× PCR Gold Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL, 各 2 mmol/L dNTP 混合液 5 μL, 45 μmol/L 357F-GC 和 517R 各 0.5 μL, 5 U/μL Ampli Taq Gold(Perkin Elmer Japan)0.2 μL.PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min, 93 ℃ 1 min,48 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min 10 s,共 30 个循环,最后在 72 ℃ 下延伸 3 min 50 s.PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

DGGE: 采用 DCode™ 系统(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA).聚丙烯酰胺梯度胶浓度为 6%~12%(质量浓度),电泳缓冲液为 0.5× TAE(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 10 mmol/L acetic acid, 0.5 mmol/L EDTA),变性剂梯度为 20%~60%[100% 的变性剂组成为尿素 7 mol/L,甲酰胺 40%(体积分数)],于恒定电压 200 V 和 61 ℃ 下电泳 5 h,SYBR Green I(Molecular Probes, Eugene, Ore)染色 30 min,紫外凝胶成像系统分析结果<sup>[10]</sup>.从 DGGE 胶中回收的 DNA 条带,在相同反应条件下再次扩增,扩增产物经 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)纯化,并检测为单个条带后用于测序<sup>[11]</sup>.测序反应使用 ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems),在 ABI 3130xl 测序仪 (Applied Biosystems Japan)上测序,操作过程按 Applied Biosystems 公司操作说明书进行.

1.9 核苷酸序列的基因库登录号

本实验所得 DGGE 条带序列(16S rDNA V3 区

域)已向 GenBank/EMBL/DDBJ 递交,并获取以下登录号: DQ515874-DQ515889.

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵物的外观品质和 pH 变化

稻秆接种 SFC-2 发酵后第 2 d 开始出现颜色上的差异,发酵 30 d 后比未接种对照颜色发黄发亮,质地松软,发出酸甜香味;相反,对照颜色暗,质地坚硬,发出带霉菌味刺激性酸味.发酵 2 d 后 pH 由原材料的 6.3 降至 4.0,而未接种对照为 4.5,发酵 15 d 后接种组降至 3.8,对照为 4.1,以后基本稳定.可见接种组的 pH 下降速度明显快于不接菌对照,而且最终 pH 也较低.

### 2.2 化学成分变化

发酵 30 d 后其化学成分变化如表 1 所示.由表 1 可知,对照与接种发酵料中可溶性糖含量分别为 6.37% 和 6.35%,粗蛋白含量分别为 5.13% 和 5.66%,接种后其粗蛋白含量提高了 10.16%,粗纤维含量分别为 33.44% 和 32.36%,接种后粗纤维含量降低了 3.2%.

用 GC-MS 测定了稻秆未接种与接种发酵 30 d 内的发酵产物,结果都检测到乙醇、乙酸、2,3-丁二醇、L-乳酸、D-乳酸和甘油,如图 1 所示.另外对照中还检测到异丁酸和丁酸.同时对 L-乳酸、D-乳酸和乙酸的生成量进行了定量分析,发酵 30 d 内,接种后其发酵料中乳酸含量较对照明显增加,表现出逐步上升,到 15 d 时基本达到高峰,然后又呈逐步减少的趋势,而乙酸的含量则是接种后较对照稍有降

低趋势(数据未列出).其发酵 30 d 的值如表 1 所示.发酵 30 d 时对照的 L-乳酸含量为  $7.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,接种的为  $18.53\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,较对照提高了 159.52%,D-乳酸含量接种后较对照提高了 113.20%,总乳酸含量接种后较对照提高了 139.49%.乙酸量,对照为  $8.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,接种后为  $7.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,较对照降低了 3.22%,总体乳酸与乙酸的比率接种后较对照提高了 147.46%.乳酸和乙酸多有利于 pH 降低,抑制其他有害菌的生长,保持饲料的发酵品质.但乙酸含量过多可使动物倒牙,甚至引起中毒,而异丁酸、丁酸等是影响饲料品质的物质<sup>[12]</sup>.

表 1 稻秆未接种与接种发酵 30 d 后  
化学成分分析(基于干物质基础)

Table 1 Chemical analyses of the fermented straws  
after 30 days of fermentation and control(DM basis)

| 项目                                  | 对照    | 接种    | 增减率/%    |
|-------------------------------------|-------|-------|----------|
| pH                                  | 4.11  | 3.80  | - 7.50   |
| 乳酸/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$   | 12.66 | 30.32 | + 139.49 |
| L-乳酸/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 7.14  | 18.53 | + 159.52 |
| D-乳酸/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 5.53  | 11.79 | + 113.20 |
| 乙酸/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$   | 8.08  | 7.82  | - 3.22   |
| 乳酸/乙酸                               | 1.57  | 3.88  | + 147.46 |
| 可溶性糖/%                              | 6.37  | 6.35  | - 0.30   |
| 粗蛋白/%                               | 5.13  | 5.66  | + 10.16  |
| 粗纤维/%                               | 33.44 | 32.36 | - 3.20   |

### 2.3 微生物活菌数

对未接种及接种稻秸发酵过程中的乳酸菌、一般细菌和酵母的活菌数进行了测定.结果如图 2 所示.由图 2 可见,在发酵 30 d 内接种的对数值发酵料中乳酸菌数始终多于未接种的,其中发酵 2 d 时乳酸菌数较低,对照和接种的对数值分别为 6.96 和 7.13 CFU/g,发酵 7 d 时达到高峰,分别为 8.22 和 8.82 CFU/g,以后又逐渐减少,到发酵 30 d 时分别为 6.16 和 7.56 CFU/g.一般细菌数从发酵 2~30 d 内表现出逐渐减少的趋势,其中接种较对照少.一般细菌在发酵 2 d 时最高,对照与接种的对数值分别为 8.78 和 7.06 CFU/g,发酵 30 d 时分别降到 6.1 和 2.0 CFU/g.酵母数量较前两者少,发酵 30 d 后,对照与接种对数值分别为 4.05 和 3.61 CFU/g.

### 2.4 发酵过程中微生物菌群变化

对稻秆发酵 30 d 内的微生物菌群变化进行了 PCR-DGGE 分析,如图 3 和表 2 所示,未接种的对照从发酵的第 2~30 d 出现多种条带,在回收的 16 个条带中,经 BLAST 数据库比对,主要近缘种为 *Enterobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter endosymbiont* 和 *Pantoea ananatis* 等杂菌.

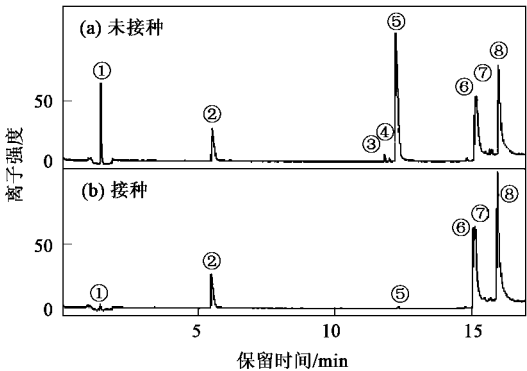


图 1 稻秆未接种与接种发酵 30 d 后  
GC-MS 测定的发酵产物图谱

Fig.1 GC-MS spectrometry maps of volatile products  
of the rice straw between the control and the inoculated  
with the SFC-2 after 30 d fermentation

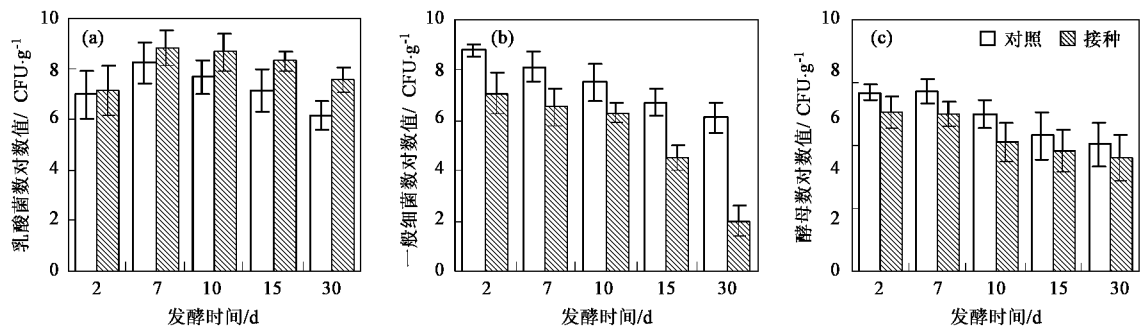


图 2 乳酸菌、一般细菌及酵母数量随发酵时间的变化

Fig.2 Viable cell count of lactic acid bacteria and bacteria and yeast with fermentation time

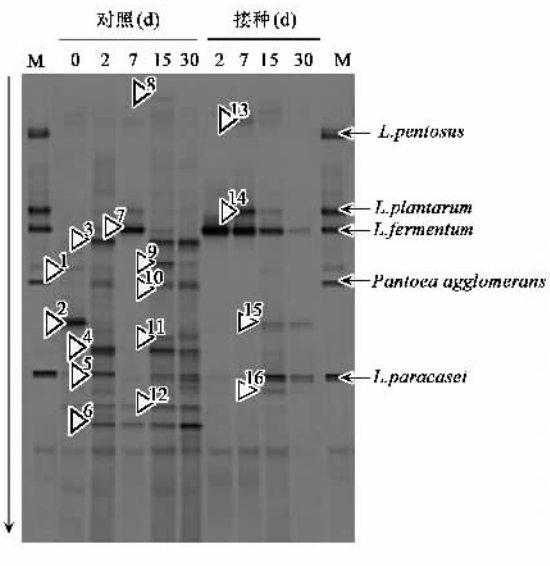
而接种发酵过程中在对照中看到的大部分条带消失,在发酵第 2 d 和 7 d 条带 7(*L. fermentum*)和条带 14(*L. plantarum*)最显著,发酵 15 d 时又以条带 5(*L. paracasei*)和条带 7 最显著,发酵 30 d 后主要留下条带 5 和条带 7,还有少量的条带 15(Uncultured bacterium).说明在整个 30 d 的稻秆发酵中,*L. plantarum*、*L. fermentum* 和 *L. paracasei* 占绝对优势,这 3 种菌株均为添加的 SFC-2 复合系中的主要组成菌.可见添加 SFC-2 后,复合系中的优势菌群很快成为发酵体系中的优势菌群,从而抑制了其他杂菌的生长.这与上述用传统平板计数法测得的微生物菌落数的结果相一致.

3 讨论

本实验将 SFC-2 接种于稻秆后,与未接种的对照相比,表现出明显的优良效果.首先能使发酵料的 pH 迅速下降,稻秆接种发酵 2 d 后 pH 从原材料的 6.3 降为 4.0,而未接种的为 4.5.有资料显示,当 pH 低于 5 以下时异型发酵菌的生长被抑制,而同型发酵菌的数量开始增加<sup>[13]</sup>,同型发酵菌会将糖有效地转化为乳酸,使发酵料酸化,从而抑制了其他有害菌的生长<sup>[14]</sup>.

表 2 图 3 中各条带的近缘菌株

| Table 2 Identities of PCR-DGGE bands in Fig.3 |                                     |           |       |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|-------|
| 条带                                            | 近缘种名称                               | 登录号       | 相似率/% |
| 1                                             | Uncultured bacterium                | AF499356  | 96.9  |
| 2                                             | Uncultured bacterium                | AB254251  | 100.0 |
| 3                                             | <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium | AY538694  | 99.5  |
| 4                                             | <i>Enterobacter sakazakii</i>       | AY752936  | 91.0  |
| 5                                             | <i>Lactobacillus paracasei</i>      | DQ199664  | 99.5  |
| 6                                             | <i>Pantoea agglomerans</i>          | AM050139  | 100.0 |
| 7                                             | <i>Lactobacillus fermentum</i>      | LCE575812 | 97.9  |
| 8                                             | <i>Lactobacillus gasseri</i>        | AM117166  | 96.9  |
| 9                                             | <i>Lactobacillus apis</i>           | AY667701  | 98.4  |
| 10                                            | <i>Lactobacillus farciminis</i>     | AY341562  | 100.0 |
| 11                                            | <i>Pantoea ananatis</i>             | AY173023  | 100.0 |
| 12                                            | <i>Enterobacter endosymbiont</i>    | AY753173  | 100.0 |
| 13                                            | <i>Lactobacillus fermentum</i>      | AM117178  | 98.4  |
| 14                                            | <i>Lactobacillus plantarum</i>      | AL935258  | 99.3  |
| 15                                            | Uncultured bacterium                | AB254251  | 99.1  |
| 16                                            | Uncultured bacterium                | DQ221347  | 99.5  |



M-Marker 箭头指向:变性剂(20% ~ 60%),  
聚丙烯酰胺胶梯度(6% ~ 12%)

图 3 未接种与接种发酵料中微生物菌系变化的 PCR-DGGE 图谱

Fig.3 DGGE profiles of the rice straw between the control and the inoculated

其次接种使发酵料中乳酸产生量增多,尤其是 L-乳酸含量,接种发酵 30 d 后 L-乳酸含量比对照提高了 159.52%.在动物营养学上,L-乳酸被视为代谢型,而 D-乳酸被视为非代谢型或难代谢型<sup>[15]</sup>.乳酸是 1 种调味剂,可提高饲料的适口性,提高幼畜的消化机能,调节消化道内酸度,利于动物健康<sup>[12]</sup>.因此

L-乳酸比率的提高对提高发酵饲料品质具有重要的意义.

从接种发酵后菌群变化的 PCR-DGGE 图谱(图 3)及其条带的近缘菌株(表 2)可见,未接种的对照微生物种类多,其中含有 *Enterobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter endosymbiont* 和 *Pantoea ananatis* 等杂菌,而接种处理主要有 *L. plantarum*、*L. fermentum* 和 *L. paracasei* 3 种菌的条带.说明 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.至于 SFC-2 对杂菌的抑制作用机理和菌株间的相互关系有待进一步研究.

农作物秸秆通过饲料化发酵,对于治理由秸秆引起的环境污染,有效利用生物资源,促进我国节粮型畜牧业发展具有重要的意义.

#### 4 结论

(1)通过接种 SFC-2 加快了干秸秆发酵物的 pH 下降,乳酸产生量显著增加,作为饲料的外观品质明显得到改善.

(2)SFC-2 接种后在秸秆发酵物中稳定定殖,显著抑制了杂菌繁殖,保证了发酵饲料的品质.

(3)将农作物秸秆转化为饲料是治理我国秸秆公害,促进我国节粮型畜牧业发展的有效途径之一.

#### 参考文献:

[ 1 ] 杨孝海. 秸秆禁烧与综合利用的问题与对策 [J]. 甘肃农业, 2003, (8): 23.

[ 2 ] 闫红秋,李霞. 焚烧农作物秸秆的危害及防止对策 [J]. 云南环境科学, 2001, 20(2): 23 ~ 24.

[ 3 ] 郭庭双, Sanchez M D, 郭佩玉. 秸秆养畜——中国的经验 [A]. 见: 联合国粮食及农业组织. 粮农组织家畜生产及卫生文集 149 [C]. 罗马: 联合国粮食及农业组织, 2002. 186.

[ 4 ] 曹建峰. 秸秆的综合利用技术分析 [J]. 能源研究与信息, 2006, 22(1): 22 ~ 25.

[ 5 ] McAllister T A, Feniuk R, Mir Z, *et al.* Inoculants for alfalfa silage: on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers [J]. Livestock Production Science, 1998, 53: 171 ~ 181.

[ 6 ] 高丽娟,王小芬,杨洪岩,等. 秸秆发酵乳酸菌复合系 SFC-2 的构建及其组成多样性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1088 ~ 1094.

[ 7 ] Thomas T A. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage [J]. J Sci Food Agric, 1977, 28: 639 ~ 642.

[ 8 ] 朱燕, 夏玉宇. 饲料品质检验 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 10 ~ 30.

[ 9 ] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 5278 ~ 5280.

[ 10 ] Wang X F, Hanuta S, Cui Z J, *et al.* Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 57: 106 ~ 115.

[ 11 ] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, *et al.* Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 5142 ~ 5150.

[ 12 ] 陈喜斌. 饲料学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[ 13 ] Cai Y, Benno Y, Ogawa M, *et al.* Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2982 ~ 2987.

[ 14 ] Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S Ribosomal DNA analysis [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 444 ~ 451.

[ 15 ] Dunlop R H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis [A]. In: Brandly C A, Comelius C E (eds.) Advances in veterinary science and comparative medicine [M]. New York: Academic Press, 1972. 259 ~ 294.