

不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮 饲料青贮品质的影响

赵牧其尔 包 健 王志军 都 帅 刘健良 邹雨琪 潘泽宇 贾玉山 格根图*
(内蒙古农业大学草原与资源环境学院, 农业农村部饲草栽培、加工与高效利用重点实验室, 呼和浩特 010019)

摘 要: 本试验通过评价不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料营养品质、发酵品质和菌群多样性的影响, 旨在改善天然草地牧草的青贮品质。以草甸草原天然草地牧草为青贮原料, 设置对照(CK)以及添加发酵黏液乳杆菌(LF)、草广泛乳杆菌(LG)、植物乳植物杆菌(LP)和布氏迟缓乳杆菌(LB)5个处理, 每个处理设3个重复, 贮藏60 d后取样测定其营养品质、发酵品质和细菌群落结构相关指标。结果显示: 与CK处理相比, 添加4种乳酸菌添加剂均不同程度地改善了天然草地牧草青贮饲料的发酵品质并减少了营养成分的损失。其中, LG处理的pH最低且乳酸含量最高, LF和LB处理的乙酸和氨态氮含量显著高于其他处理($P<0.05$), 各处理中均未检测到丁酸; LG处理的可溶性碳水化合物含量最高, LF和LG处理的中性洗涤纤维含量显著低于其他处理($P<0.05$)。基于高通量测序发现, 布氏迟缓乳杆菌、植物乳植物杆菌和发酵黏液乳杆菌是4种乳酸菌添加剂处理中丰度较高的菌种, 而在CK处理中则以短促生乳杆菌和肠膜明串珠菌为主, 且还存在一定比例的不良细菌。综上所述, 结合营养品质、发酵品质和菌群多样性等指标综合评价, 以添加草广泛乳杆菌时天然草地牧草青贮饲料的青贮品质最好。

关键词: 天然草地牧草; 乳酸菌; 青贮品质; 微生物多样性

中图分类号: S54

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2024)05-3352-11

近年来, 伴随着草牧业的迅猛发展, 优质饲草料供给存在着巨大的缺口, 广袤的草原面积为我国供应了丰富的天然草地牧草资源, 因此合理且高效地利用天然草地牧草资源对保障饲草料供应具有重大意义^[1]。目前, 青贮是提高天然草地牧草饲料质量的常用手段^[2], 然而, 与其他优质的青贮原料相比, 天然草地牧草因其“三低一高”的特性, 在无外源添加剂的情况下, 很难制成优质青贮饲料^[3]。添加剂是提高青贮饲料品质的重要手段, 通过添加不同种类的添加剂可以调控天然草地牧草青贮发酵进程并改善其品质, 而乳酸菌添加剂在其中起着举足轻重的地位^[4]。Li等^[5]将乳酸菌添加到赤峰市典型草原天然草地牧草青贮

中, 得出各处理均有效降低了青贮饲料的pH和氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)含量, 提高了乳酸(LA)含量, 改善了青贮品质。Zhang等^[6]研究发现, 植物乳植物杆菌(*Lactobacillus plantarum*) [曾用名: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)] 和布氏迟缓乳杆菌(*Lentilactobacillus buchneri*) 的添加, 在保证了一大部分营养物质不被消耗的同时, 抑制了不良微生物的繁殖活动。

当前的研究主要集中在商业菌剂对天然草地牧草青贮品质的影响, 但将天然草地牧草本身筛选出的乳酸菌应用到天然草地牧草青贮的研究较少。为合理利用天然草地牧草资源, 提高天然草地牧草青贮饲料的品质, 深入地了解青贮饲料中

收稿日期: 2023-11-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0111000-3); 国家牧草产业技术体系(CARS-34)

作者简介: 赵牧其尔(1996—), 女, 内蒙古兴安盟人, 博士研究生, 从事牧草加工与利用研究。E-mail: zhaomuqier@163.com

* 通信作者: 格根图, 教授, 博士生导师, E-mail: gegentu@163.com

的菌群组成及其相对丰度。近年来, Pacific Bioscience 公司的单分子实时测序 (single molecule real-time sequencing, SMRT) 技术因其读数段长、速度快和精度准的特点而开始应用于饲草青贮的研究当中^[7]。SMRT 技术可以在物种水平上鉴定生物体, 并已应用于意大利黑麦草^[8]和柱花草^[9]的青贮饲料, 而在天然草地牧草青贮中则鲜见报道。因此, 本研究旨在探讨不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮营养品质、发酵品质和菌群多样性的影响, 对比不同乳酸菌的应用效果, 为天然草地牧草的高效利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于内蒙古锡林郭勒盟乌拉盖牧场的

草甸草原试验示范区, 在乌拉盖管理区东北 67 km 处 (44°04'19"N, 119°13'43"E), 海拔高达 930 m, 属半干旱大陆性气候, 年降雨量为 280~420 mm, 其中 70% 分布于 6—8 月份, 无霜期 90~110 d, 土壤类型以暗栗钙土为主。

1.2 试验材料

供试材料为 2021 年 7 月 25 日收获自锡林郭勒草原的天然草地牧草, 样地的植物总盖度为 50%~70%, 详细信息如表 1 所示。供试乳酸菌添加剂发酵黏液乳杆菌 (*Limosilactobacillus fermentum*) 和草广泛乳杆菌 (*Latilactobacillus graminis*) 来自于内蒙古农业大学草产品加工实验室, 植物乳植物杆菌购自山东中科嘉亿生物工程有限公司, 布氏迟缓乳杆菌购自江苏绿科生物技术有限公司。

表 1 天然草地牧草中植物种类及其优势度

Table 1 Plant species in natural pasture grass and their dominance degrees

%

编号 No.	中文名称 Chinese name	拉丁名 Latin name	科 Family	优势度 SDR
1	大针茅	<i>Stipa grandis</i> P.A. Smirn.	禾本科	10.62
2	贝加尔针茅	<i>Stipa baicalensis</i> Roshev	禾本科	5.78
3	羊草	<i>Leymus chinensis</i> (Trin.) Tzvel.	禾本科	25.51
4	冰草	<i>Agropyron cristatum</i> (L.) Gaertn.	禾本科	4.49
5	糙隐子草	<i>Cleistogenes squarrosa</i> (Trin.) Keng	禾本科	6.98
6	火絨草	<i>Leontopodium leontopodioides</i> (Willd.) Beauv.	菊科	4.38
7	差巴嘎蒿	<i>Artemisia halodendron</i> Turcz. et Bess.	菊科	7.85
8	冷蒿	<i>Artemisia frigida</i> (Willd.) Bess	菊科	1.06
9	猪毛蒿	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst. et Kit.	菊科	2.18
10	麻花头	<i>Klasea centauroides</i> (L.) Cass.	菊科	5.11
11	阿尔泰狗娃花	<i>Heteropappus altaicus</i> (Willd.) Novopokr	菊科	1.35
12	扁蓿豆	<i>Melissilus ruthenicus</i> (L.) Peschkova (<i>Trigonella ruthenica</i> L.)	豆科	1.79
13	沙打旺	<i>Astragalus adsurgens</i> Pall.	豆科	1.28
14	瓦松	<i>Orostachys fimbriata</i> (Turcz.) Berg.	景天科	3.25
15	防风	<i>Saposhnikovia divaricate</i> (Trucz.) Schischk.	伞形科	1.70
16	地榆	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	蔷薇科	3.32
17	翻白委陵菜	<i>Potentilla discolor</i> Bunge	蔷薇科	1.29
18	银灰旋花	<i>Convolvulus ammannii</i> Desr.	旋花科	2.66
19	鼠尾草	<i>Salvia japonica</i> Thunb.	唇形科	1.80
20	报春花	<i>Primula malacoides</i> Franch.	报春花科	1.45
21	蒙古韭	<i>Allium mongolicum</i> Regel.	百合科	2.00
22	狼毒	<i>Arisaema lobatum</i> Engl.	大戟科	4.15

1.3 试验设计

试验采用单因素随机区组设计, 设置 5 个处理, 即对照 (CK) 以及添加发酵黏液乳杆菌 (LF)、草广泛乳杆菌 (LG)、植物乳植物杆菌 (LP) 和布氏

迟缓乳杆菌 (LB) 处理, 每个处理做 3 次重复。乳酸菌添加剂的添加量为 1×10^5 CFU/g FM, 按照处理将各乳酸菌以 30 mL/kg FM 溶液的形式喷洒入经切短至 1~2 cm 的天然草地牧草中, 对照处理喷

洒等量的无菌水,之后装入聚乙烯无菌袋,每袋约 250 g,使用真空包装机真空密封,室温条件下青贮 60 d 后开袋,取样分析相关指标。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 营养成分含量

采用 105 ℃ 烘干法^[10]测定干物质 (dry matter, DM) 含量;采用 GB/T 6438—2007 中方法测定粗灰分含量后,根据粗灰分含量计算出有机物 (organic matter, OM) 含量;参照 GB/T 6432—2018 中方法测定粗蛋白质 (crude protein, CP) 含量;使用 Ankom 2000 型纤维分析仪按照所附说明书测定酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF) 和中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF) 含量;使用 VELP SER148/6 脂肪测试仪按照所附说明书测定粗脂肪 (ether extract, EE) 含量;采用蒽酮-硫酸比色法^[11]测定可溶性碳水化合物 (water-soluble carbohydrate, WSC) 含量。

1.4.2 发酵品质

采用四分法取 10 g 天然草地牧草鲜样或青贮样品,与 90 mL 无菌水混合,利用医用纱布和滤纸过滤后立即用 pH 计测定 pH,然后使用高效液相色谱仪测定有机酸含量^[12],采用苯酚-次氯酸比色法^[13]测定氨态氮 (ammonia nitrogen, NH₃-N) 含量。

1.4.3 菌群多样性

将每个处理的天然草地牧草样品充分混合均匀后,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取天然草地牧草青贮饲料的总 DNA,并对全长 16S rRNA 进行 PCR 扩增,利用 PacBio Seque 平台进行测序,使用 USEARCH 软件在相似性 97% 的水平上进行操作分类单元 (OTU) 的聚类,然后使用 QIIME2 中的 DADA2 方法对质控后的数据进行去噪处理,得到最优序列,再进行菌群多样性分析。

1.5 数据处理与分析

利用 Excel 2021 对试验原始数据进行预处理分析。使用 SAS 9.2 软件对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),并采用 Duncan 氏法进行组间差异的多重比较。利用 QIIME2 软件平台进行菌群的 α 多样性分析 (Chao1、Shannon、ACE 和 Coverage 指数),采用 R 语言相关软件进行主成分分析 (PCA) 并作图。

2 结果与分析

2.1 天然草地牧草的原料特性

表 2 显示了天然草地牧草原料的营养品质。天然草地牧草中 DM 含量以鲜重计为 50.12%;以干重计,天然草地牧草中 OM 含量为 94.65%,CP 含量为 11.15%,NDF 含量为 64.87%,ADF 含量为 39.88%,EE 含量为 3.23%,WSC 含量为 1.78%。

表 2 天然草地牧草的营养成分
Table 2 Nutritional components of natural pasture grass

项目 Item	干物质 DM/% FM	有机物 OM/% DM	粗蛋白质 CP/% DM	中性洗 涤纤维 NDF/% DM	酸性洗 涤纤维 ADF/% DM	粗脂肪 EE/% DM	可溶性碳 水化合物 WSC/% DM
含量 Content	50.12±0.39	94.65±0.24	11.15±0.16	64.87±0.63	39.88±0.14	3.23±0.16	1.78±0.12

2.2 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料营养品质的影响

由表 3 可知,相较于 CK 处理,乳酸菌添加剂处理的 DM 和 WSC 损失更低,其中,LP 处理的 DM 含量最高,LG 处理的 WSC 含量最高;与 CK 相比,LF 和 LP 处理的 OM 含量显著提高 ($P < 0.05$);各处理的 CP、ADF 和 EE 含量均无显著差异 ($P > 0.05$),但 LP 处理表现出了更高的 CP 含量和更低的 ADF 含量;与 CK 和 LB 处理相比,LF 和 LG 处理的 NDF 含量显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料发酵品质的影响

由表 4 可知,同 CK 处理相比,添加各乳酸菌添加剂均显著降低了天然草地牧草青贮饲料的 pH ($P < 0.05$),其中以 LG 处理的 pH 最低;与 pH 的变化相反,除了 LB 处理以外,各乳酸菌添加剂处理的 LA 含量均高于 CK 处理,以 LG 处理的 LA 含量最高,其与 CK 处理的差异达到显著水平 ($P < 0.05$);与 CK 处理相比,各乳酸菌添加剂处理的乙酸 (AA) 含量均有所提高,其中 LF 处理显著高于 CK 和 LP 处理 ($P < 0.05$);LB 处理的青贮饲料中

未检测到丙酸(PA),同CK和LP处理相比,LF和LG处理的PA含量显著降低($P<0.05$);各处理的青贮饲料中均未检测到丁酸(BA);同CK处理相

比,各乳酸菌添加剂处理的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量均有所降低,其中LF和LB处理与CK处理差异显著($P<0.05$)。

表3 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料营养品质的影响

Table 3 Effects of different lactic acid bacteria additives on nutritional quality of natural pasture grass silage

处理 Treatments	干物质 DM/% FM	有机物 OM/% DM	粗蛋白质 CP/% DM	中性洗 涤纤维 NDF/% DM	酸性洗 涤纤维 ADF/% DM	粗脂肪 EE/% DM	可溶性碳水 化合物 WSC/% DM
CK	41.88±0.27	93.57±0.06 ^b	10.27±0.08	58.30±1.03 ^a	35.41±0.02	3.61±0.03	0.84±0.04
LF	42.81±0.21	93.93±0.02 ^a	10.76±0.06	55.21±0.30 ^b	35.12±0.82	3.22±0.09	0.90±0.02
LG	42.36±0.80	93.52±0.09 ^b	10.69±0.26	54.47±1.02 ^b	34.69±0.33	3.48±0.12	0.94±0.01
LP	43.64±0.21	93.93±0.08 ^a	10.87±0.20	56.57±0.52 ^{ab}	34.55±0.95	3.43±0.08	0.87±0.02
LB	43.14±0.07	93.79±0.13 ^{ab}	10.10±0.44	58.23±0.68 ^a	35.11±0.39	3.29±0.16	0.85±0.03
均值标准误 SEM	0.304 5	0.086 6	0.149 3	0.774 1	0.157 6	0.069 2	0.042 3
P 值 P-value	0.081 7	0.034 0	0.230 0	0.035 0	0.811 6	0.155 1	0.218 7

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$)。表4同。

In the same column, values with different lowercase letter superscripts indicated significant difference ($P<0.05$), while with the same lowercase letter or no letter superscripts indicated no significant difference ($P>0.05$). The same as Table 4.

表4 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料发酵品质的影响

Table 4 Effects of different lactic acid bacteria additives on fermentation quality of natural pasture grass silage

处理 Treatments	pH	乳酸 LA/ (g/kg FM)	乙酸 AA/ (g/kg FM)	丙酸 PA/ (g/kg FM)	丁酸 BA/ (g/kg FM)	氨态氮 $\text{NH}_3\text{-N}/$ (g/kg FM)
CK	4.79±0.04 ^a	8.64±0.03 ^b	4.73±0.13 ^c	1.37±0.08 ^a	ND	4.16±0.15 ^a
LF	4.33±0.02 ^{cd}	9.01±0.32 ^b	5.99±0.26 ^a	0.11±0.11 ^c	ND	3.45±0.23 ^{bc}
LG	4.20±0.02 ^d	9.60±0.23 ^a	5.35±0.23 ^{abc}	0.53±0.03 ^b	ND	3.80±0.16 ^{abc}
LP	4.40±0.06 ^c	9.06±0.20 ^{ab}	4.88±0.27 ^{bc}	1.39±0.19 ^a	ND	4.07±0.16 ^{ab}
LB	4.65±0.03 ^b	8.60±0.14 ^b	5.55±0.20 ^{ab}	0.00±0.00 ^c	ND	3.32±0.22 ^c
均值标准误 SEM	0.108 0	0.180 2	0.221 9	0.317 5		0.165 3
P 值 P-value	<0.000 1	0.015 9	0.026 3	<0.000 1		0.036 9

ND 表示未检测到。ND mean not detected.

2.4 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料菌群多样性的影响

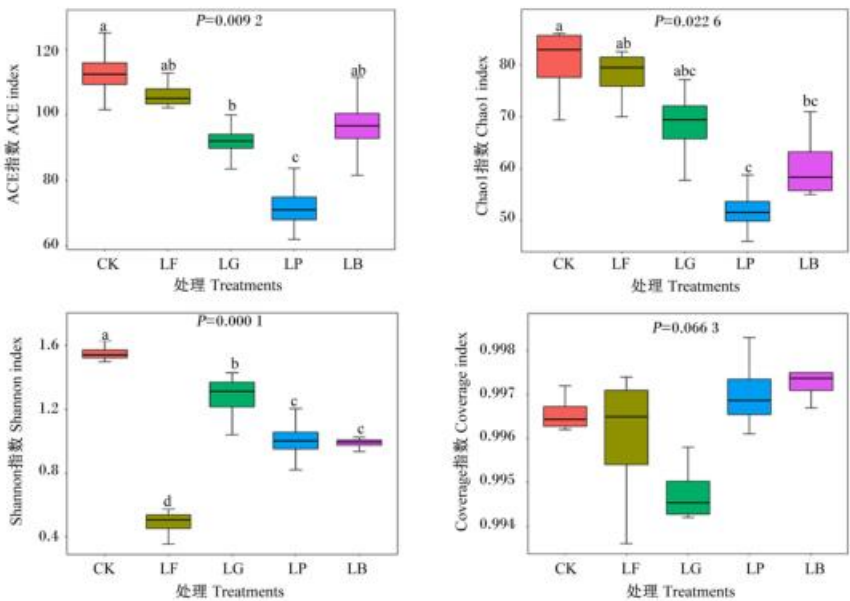
2.4.1 天然草地牧草青贮饲料的菌群 α 多样性分析

如图1所示,不同乳酸菌添加剂对ACE、Chao1和Shannon指数具有显著影响($P<0.05$)。CK处理的ACE、Chao1和Shannon指数均高于各乳酸菌添加剂处理,表明乳酸菌添加剂使青贮饲料中菌群的丰富度及多样性发生了改变;各处理的Coverage指数均大于0.99,且差异不显著($P>$

0.05),表明测序结果均很好地代表了样本中的细菌群落的真实情况。

2.4.2 天然草地牧草青贮饲料的菌群 β 多样性分析

如图2所示,主成分1(PC1)的贡献率为88.90%,主成分2(PC2)的贡献率为8.75%,CK处理分布在第4象限,而各乳酸菌添加剂处理则主要分布在第2、3象限。CK处理距离其他处理较远,说明其菌群结构与各乳酸菌添加剂处理差异较大。LF与LB处理、LG与LP处理之间的距离较近,表明它们之间菌群构成差异较小。



数据柱标注不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 无字母或相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

Data columns with different lowercase letters indicated significant difference ($P<0.05$), while with the same no lowercase letters indicated no significant difference ($P>0.05$).

图 1 天然草地牧草青贮饲料的菌群 α 多样性指数分析

Fig.1 Analysis of bacterial community α diversity indexes of natural pasture grass silage

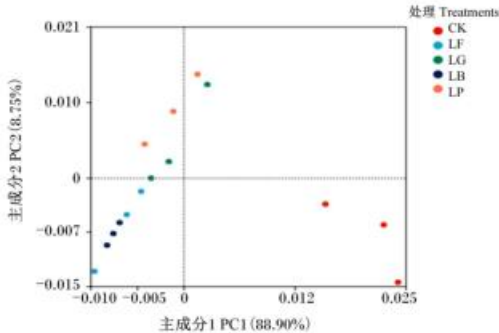


图 2 天然草地牧草青贮饲料的菌群 β 多样性分析 (主成分分析)

Fig.2 Analysis of bacterial community β diversity (PCA) of natural pasture grass silage

2.4.3 天然草地牧草青贮饲料的细菌群落结构分析

物种分类信息的差异说明了细菌群落结构变化对乳酸菌添加剂的响应。如表 5 所示,在属水平上,迟缓乳杆菌属 (*Lentilactobacillus*)、促生乳杆菌属 (*Levilactobacillus*)、乳植物杆菌属 (*Lactiplantibacillus*) 和黏液乳杆菌属 (*Limosilactobacillus*) 为各处理中的优势菌属;在种水平上,各乳酸菌添加剂处理中布氏迟缓乳杆菌、植物乳植物杆菌和

发酵黏液乳杆菌相对丰度较高,而 CK 处理中则以短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*) 和肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 为主。

LEfSe 方法被用来评估不同样品之间细菌群落组成的差异,并探索各样品中的特定细菌种类。不同乳酸菌添加剂处理下天然草地牧草青贮饲料细菌群落的 LEfSe 分析结果如图 3 所示。当判别分析 (LDA) 得分 >4.0 时,CK 处理中有 5 个细菌显著富集,LG 处理中有 1 个细菌显著富集,LP 和 LB 处理中各有 2 个细菌显著富集。

2.4.4 天然草地牧草青贮饲料附着细菌群落功能分析

不同乳酸菌添加剂处理的天然草地牧草青贮饲料附着细菌群落不同水平的 PICRUST 2 功能预测分析如图 4 所示。在 1 级通路水平上,细菌群落功能主要为代谢、基因信息处理、环境信息处理、人类疾病、细胞代谢过程和有机系统 6 大类,其中代谢途径占据着绝对的优势地位;在 2 级通路水平上,细菌群落功能主要富集在碳水化合物代谢、脂质代谢、核苷酸代谢、氨基酸代谢、其他次生代谢产物的生物合成和膜传输等通路中,且各乳酸菌添加剂处理间差异不大;在 3 级通路水平上,排

名前 20 的代谢通路中有 15 条属于代谢途径,碳水化合物代谢和氨基酸代谢仍是最主要的代谢通路,各乳酸菌添加剂处理在氨基酸代谢的 3 条通

路中丰度较高,但在核苷酸代谢、聚糖的生物合成和代谢通路中呈现了不同的丰度。

表 5 不同乳酸菌添加剂处理下天然草地牧草青贮饲料的细菌群落组成

Table 5 Bacterial community composition of natural pasture grass silage treated with different lactic acid bacteria additives

属水平 Genus levels	种水平 Species levels	处理 Treatments					均值 标准误 SEM	P 值 P-value
		CK	LF	LG	LP	LB		
迟缓乳杆菌属 <i>Lentilactobacillus</i>	布氏迟缓乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i>	1.38 $\pm 0.19^d$	84.42 $\pm 0.90^{ab}$	65.22 $\pm 1.10^c$	78.30 $\pm 2.10^b$	84.88 $\pm 0.40^a$	15.769 4	<0.000 1
促生乳杆菌属 <i>Levilactobacillus</i>	短促生乳杆菌 <i>Levilactobacillus brevis</i>	79.20 $\pm 4.50^a$	0.73 $\pm 0.21^b$	4.20 $\pm 0.21^b$	1.61 $\pm 0.42^b$	1.36 $\pm 0.24^b$	15.456 3	<0.000 1
乳植物杆菌属 <i>Lactiplantibacillus</i>	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.36 $\pm 0.56^b$	1.26 $\pm 0.08^b$	20.44 $\pm 1.82^a$	17.97 $\pm 2.32^a$	6.28 $\pm 0.53^b$	0.566 6	0.001 1
黏液乳杆菌属 <i>Limosilactobacillus</i>	发酵黏液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	0.02 $\pm 0.01^c$	10.26 $\pm 0.16^a$	0.30 $\pm 0.13^c$	0.06 $\pm 0.02^c$	4.69 $\pm 0.34^b$	2.004 1	<0.000 1
明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.25 $\pm 0.38^a$	0.03 $\pm 0.02^b$	0.17 $\pm 0.14^b$	0.02 $\pm 0.01^b$	0.35 $\pm 0.15^b$	1.422 4	0.026 2
明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	柠檬明串珠菌 <i>Leuconostoc citreum</i>	3.39 $\pm 0.19^a$	0.02 $\pm 0.01^b$	0.60 $\pm 0.06^b$	0.00 $\pm 0.00^b$	0.85 $\pm 0.44^b$	0.649 1	0.033 3
泛菌属 <i>Pantoea</i>	成团泛生菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	1.86 $\pm 0.48^a$	0.13 $\pm 0.12^a$	0.43 $\pm 0.38^a$	0.17 $\pm 0.09^a$	0.17 $\pm 0.08^a$	0.331 7	0.380 4
unclassified_ Muribaculaceae	unclassified_ Muribaculaceae	0.59 $\pm 0.02^a$	0.33 $\pm 0.14^a$	0.21 $\pm 0.01^a$	0.26 $\pm 0.16^a$	0.30 $\pm 0.04^a$	0.083 8	0.375 9
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.08 $\pm 0.04^a$	0.01 $\pm 0.01^a$	0.58 $\pm 0.54^a$	0.01 $\pm 0.01^a$	0.00 $\pm 0.00^a$	0.310 7	0.244 9
埃希氏菌属 <i>Eacherichia</i>	弗格森埃希氏菌 <i>Eacherichia fergusonii</i>	0.79 $\pm 0.29^a$	0.35 $\pm 0.34^a$	0.11 $\pm 0.04^a$	0.06 $\pm 0.03^a$	0.12 $\pm 0.03^a$	0.176 0	0.582 6
其他 Others	其他 Others	1.08 $\pm 0.01^c$	2.48 $\pm 0.25^b$	7.74 $\pm 0.52^a$	1.56 $\pm 0.14^c$	1.00 $\pm 0.17^c$	1.029 1	<0.000 1

3 讨 论

3.1 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料营养品质的影响

营养品质是评价饲草品质和商业价值的必要指标。衡量青贮饲料营养品质的一个主要指标是 DM 含量。减少 DM 的损失对于提高青贮饲料的质量具有重要的现实意义^[14]。本试验中所有乳酸菌添加剂处理和 CK 处理的 DM 含量是相似的,这可能是因为 LA 在所有组别中主导了微生物发酵,导致 DM 损失减少^[15],使得各处理间差异不大。前人的结果表明,添加剂对青贮饲料的 CP 含量没有显著影响^[16],这验证了本研究中 CK 处理和各乳酸菌添加剂处理的 CP 含量基本相同。此外,天然草地牧草中缺乏足够的发酵底物,无法快速降

低 pH、提高有机酸含量,进而抑制蛋白酶的活性,这可能是造成不同处理的 CP 含量无显著差异的另一个原因^[17]。NDF 含量在 CK 处理和 4 种乳酸菌添加剂处理之间存在一定的差异,LF 和 LG 处理的 NDF 含量显著低于其他处理。这是因为发酵黏液乳杆菌和草广泛乳杆菌能抑制好氧细菌等有害微生物的生长繁殖,有效缓解营养物质降解,因此更多的非纤维类营养物质被保留下来^[18]。在本研究中,与直接青贮相比,添加乳酸菌提高了 WSC 含量,且各乳酸菌添加剂处理的 WSC 含量也有所不同,不同乳酸菌间碳源利用能力的差异^[19]可能是造成上述结果的主要原因。

3.2 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料发酵品质的影响

青贮饲料的发酵品质评定结果主要是由 pH

和 LA 等有机酸以及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量共同决定的^[20-21]。决定青贮饲料 pH 下降的关键指标主要为 LA 和 AA。在本研究中,与 CK 处理相比,4 种乳酸菌添加剂处理的 pH 均显著降低,这主要是由于添加乳酸菌使以 LA 为主的有机酸在天然草地牧草青贮中大量积累所致;同时,草广泛乳杆菌对提高 LA 含量和降低 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量均有积极作用,这可能是由于它们具有较强的耐酸能力。4 种乳

酸菌菌株产生大量的 LA 和一定量的 AA,以降低 pH,抑制不良微生物的繁殖活动,从而提高青贮饲料的发酵品质^[22]。同样,Si 等^[23]证明,同质和异质乳酸菌接种剂均可以在青贮期间降低 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量和 pH,有所不同的是,接种了 LG 和 LP 的天然草地牧草青贮饲料显示出了更高的 LA 含量和较低的 AA 含量,这也证明这 2 个群体转向了纯 LA 发酵。

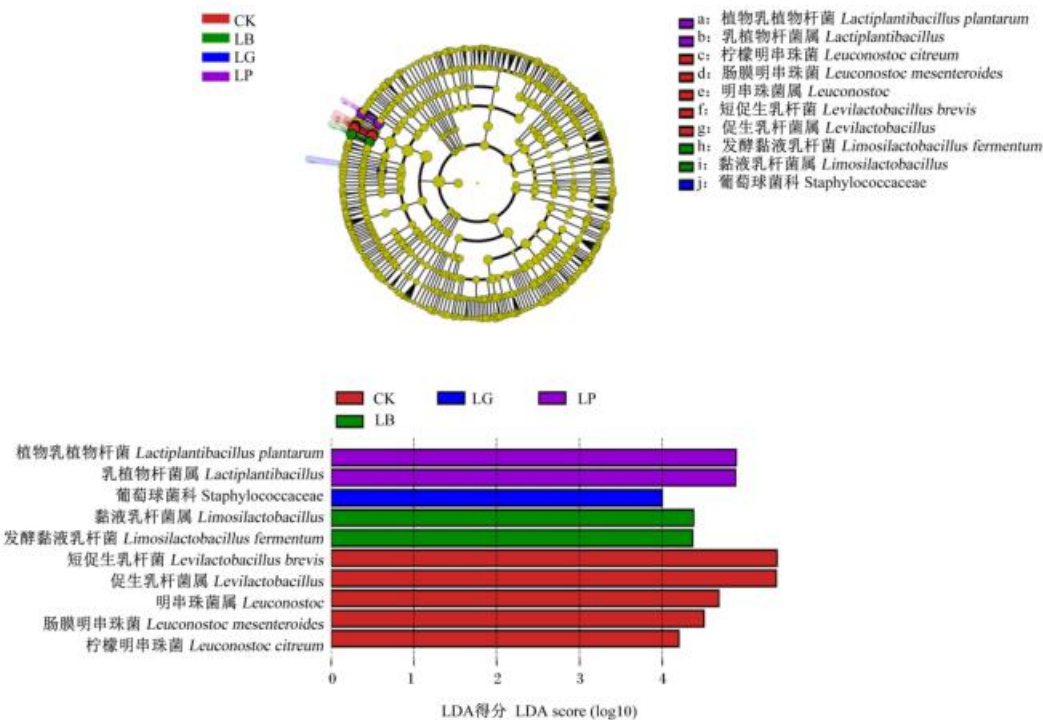


图3 不同乳酸菌添加剂处理下天然草地牧草青贮饲料细菌群落的 LefSe 分析

Fig.3 Analysis of LefSe of bacterial community of natural pasture grass silage treated with different lactic acid bacteria additives

3.3 不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料菌群多样性的影响

细菌群落结构变化、多样性和代谢产物的种类和功能是评价饲草青贮饲料发酵质量好坏的评估指标^[24]。Du 等^[25]的研究表明,SMRT 技术通过分析样品菌群全貌,最大限度地展示青贮饲料中附着细菌的种类和丰度,揭示不同青贮饲料细菌群落组成的差异性。本研究采用了 SMRT 技术在细菌区系层面阐明了 4 种乳酸菌添加剂处理下天然草地牧草青贮饲料所附着细菌群落的组成。本试验中,各处理青贮饲料样品的 Coverage 指数皆趋近于 1,表明本次测序代表了样品中微生物的

真实情况。在天然草地牧草青贮中,不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料细菌群落的 ACE、Chao1 和 Shannon 指数均造成了显著影响,但各乳酸菌添加剂处理均低于 CK 处理,说明添加乳酸菌添加剂后青贮中复杂的细菌群落会逐渐被优势乳酸菌取代^[26]。在 β 多样性分析中,不同处理中细菌群落存在明显分离现象,这表明乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料附着的细菌群落的组成和结构有显著影响。这些结果与 Zeng 等^[27]的报道一致。

细菌群落的组成和结构是青贮饲料品质特性的重要影响因素之一,乳酸菌在细菌群落中所占

的比例直接影响着青贮发酵的速率和程度。乳植物杆菌属、迟缓乳杆菌属、片球菌属、乳球菌属、肠球菌属、链球菌属、魏斯氏菌属和明串珠菌属的细菌是青贮发酵过程中所需的功能细菌,是青贮中的启动点和关键点,并且已广泛用于改善青贮饲料的质量^[14]。在不同的乳酸菌接种物处理下,青贮发酵结束后,乳酸菌是各处理青贮饲料中占比最大的细菌,在各处理中的占比均超过 90%。在种水平上,各乳酸菌添加剂处理的主要细菌均为布氏迟缓乳杆菌、植物乳植物杆菌和发酵黏液乳杆菌,这与前人的研究结果^[28]大体一致。与各乳酸菌添加剂处理相比,CK 处理的细菌群落组成更加多样化,既有多种高占比的乳酸菌,包括短促生乳杆菌、植物乳植物杆菌、肠膜明串珠菌和柠檬明串珠菌(*Leuconostoc citreum*),也存在相对低占比

的成团泛生菌(*Pantoea agglomerans*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和弗格森埃希氏菌(*Escherichia fergusonii*)等细菌,这是由于青贮 60 d 后,CK 处理仍有较高的 pH,LA 发酵过程缓慢,导致杂菌生长较多。成团泛生菌在青贮过程中与乳酸菌竞争底物,影响发酵进程^[29]。弗格森埃希氏菌是影响青贮饲料发酵的有害细菌,具有致病性,可引起动物疾病,危害家畜健康^[30]。在本试验中,各乳酸菌添加剂处理的乳酸菌相对丰度也存在一定的差异,但菌群多样性总体水平变化不大,布氏迟缓乳杆菌为处理中的优势细菌物种。Seale^[31]也发现了类似的结果,他认为异型发酵的耐酸乳杆菌属会控制青贮的最后阶段。然而,乳杆菌属物种及其比例的差异会影响青贮饲料品质。

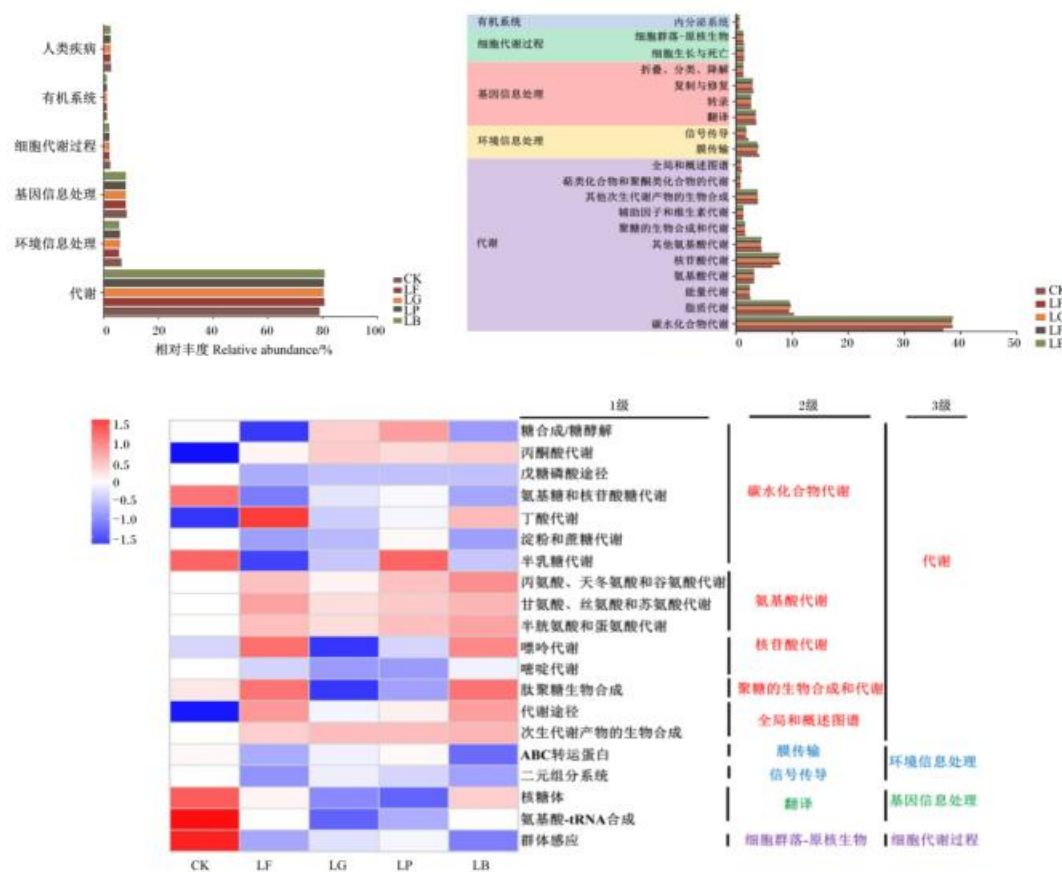


图 4 不同乳酸菌添加剂处理下天然草地牧草青贮饲料附着细菌的 PICRUSt2 功能预测分析
Fig.4 PICRUSt2 function prediction analysis of bacterial community attached to natural pasture grass silage treated with different lactic acid bacteria additives

细菌群落组成的差异会引起其代谢功能的变化,本研究利用 PICRUSt2 方法^[32]基于标记基因

测序谱预测群落功能潜力的能力,探讨不同乳酸菌添加剂对天然草地牧草青贮饲料细菌群落功能的影响。其中,氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢和脂质代谢对发酵过程中的物质转化具有显著影响^[33]。在本研究中,1级通路水平上主要为代谢和基因信息处理;2级通路水平上,碳水化合物代谢、脂质代谢和氨基酸代谢是各处理中富集最多的通路,这一结果反映了这些代谢过程一方面保证了细菌的生长,另一方面分解了青贮饲料中的蛋白质、氨基酸、脂类及碳水化合物,保证了青贮品质的提升,同时也伴随着一部分营养的损失;在3级通路水平上,氨基酸代谢仍是最主要的代谢通路,相较于CK处理,各乳酸菌添加剂处理在氨基酸代谢的3条通路中表现出了更高的丰度,青贮过程中菌群的生长繁殖易发生蛋白质水解,导致氨基酸代谢增加,从而影响青贮饲料的CP含量。这些氨基酸的代谢途径可能反映了天然草地牧草青贮饲料的优势菌群的代谢动态。

4 结 论

本研究结果表明,4种乳酸菌添加剂(发酵黏液乳杆菌、草广泛乳杆菌、植物乳杆菌和布氏迟缓乳杆菌)均提高了天然草地牧草青贮饲料的发酵品质,减少了营养成分的损失,并提高了有益菌的相对丰度。综合分析天然草地牧草青贮饲料的营养品质、发酵品质和菌群多样性,以添加草广泛乳杆菌的青贮效果最佳。

参考文献:

- [1] 韩炜.内蒙古草原地区种植面积变化及其经济影响研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古大学,2020.
HAN W. Study on the change of planting area and its economic impact in Inner Mongolia grassland [D]. Master's Thesis. Hohhot: Inner Mongolia University, 2020. (in Chinese)
- [2] 格根图,尤思涵,贾玉山,等.天然草地牧草青贮技术研究进展[J].草地学报,2016,24(5):953-959.
GE G T, YOU S H, JIA Y S, et al. Research progress in natural grass silage [J]. Acta Agrestia Sinica, 2016, 24(5): 953-959. (in Chinese)
- [3] DU S, YOU S H, JIANG X W, et al. Dynamics of the fermentation quality and microbiota in *Ephedra sinica* treated native grass silage [J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133(6): 3465-3475.
- [4] 贾玉山,于浩然,都帅,等.天然牧草青贮添加剂研究进展[J].草地学报,2018,26(3):533-538.
JIA Y S, YU H R, DU S, et al. Research progress on natural forage silage additives [J]. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(3): 533-538. (in Chinese)
- [5] LI Y Y, DU S, SUN L, et al. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on dynamic fermentation quality and microbial community of native grass silage [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 830121.
- [6] ZHANG J W, LIU Y C, WANG Z J, et al. Effects of different types of LAB on dynamic fermentation quality and microbial community of native grass silage during anaerobic fermentation and aerobic exposure [J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 513.
- [7] XU D M, DING W R, KE W C, et al. Modulation of metabolome and bacterial community in whole crop corn silage by inoculating homofermentative *Lactobacillus plantarum* and heterofermentative *Lactobacillus buchneri* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 3299.
- [8] YAN Y H, LI X M, GUAN H, et al. Microbial community and fermentation characteristic of Italian ryegrass silage prepared with corn stover and lactic acid bacteria [J]. Bioresource Technology, 2019, 279: 166-173.
- [9] WANG C, HE L W, XING Y Q, et al. Fermentation quality and microbial community of alfalfa and stylo silage mixed with *Moringa oleifera* leaves [J]. Bioresource Technology, 2019, 284: 240-247.
- [10] 贾玉山,玉柱,李存福.草产品质量检测学[M].北京:中国农业大学出版社,2011:23-40.
JIA Y S, YU Z, LI C F. Grass product quality testing [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011: 23-40. (in Chinese)
- [11] MURPHY R P. A method for the extraction of plant samples and the determination of total soluble carbohydrates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1958, 9(11): 714-717.
- [12] 孙娟娟,阿拉木斯,白春生.青贮饲料质量检测实用手册[M].北京:中国农业科学技术出版社,2017:50-60.
SUN J J, A L M S, BAI C S. Practical manual for quality testing of silage feed [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2017: 50-60. (in Chinese)
- [13] BRODERICK G A, KANG J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in

- ruminal fluid and *in vitro* media[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(1): 64-75.
- [14] CHEN M M, LIU Q H, XIN G R, et al. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their inoculating effects on the silage fermentation at high temperature [J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 56(1): 71-78.
- [15] MUCK R E. Microbiologia da silagem e seu controle com aditivos [J]. Revista Brasileira de Zootecnia, 2010, 39(Suppl. spe): 183-191.
- [16] MUCK R E. Factors influencing silage quality and their implications for management[J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(11): 2992-3002.
- [17] SOUSA D O, HANSEN H H, NUSSIO L G, et al. Effects of wilting and ensiling with or without additive on protein quality and fermentation of a lucerne-white clover mixture[J]. Animal Feed Science and Technology, 2019, 258: 114301.
- [18] XU D M, DING Z T, WANG M S, et al. Characterization of the microbial community, metabolome and biotransformation of phenolic compounds of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) silage ensiled with or without inoculation of *Lactobacillus plantarum* [J]. Biore-source Technology, 2020, 316: 123910.
- [19] 谢婷霞, 曹雪笛, 谭玉兰, 等. 乳酸杆菌的分离鉴定及其对皇竹草青贮饲料发酵品质的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(6): 4060-4070.
- XIE T X, CAO X D, TAN Y L, et al. Isolation and identification of lactobacillus and their effects on fermentation quality of *Pennisetum sinense* silage [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(6): 4060-4070. (in Chinese)
- [20] HASHEMZADEH-CIGARI F, KHORVASH M, GHORBANI G R, et al. Interactive effects of molasses by homofermentative and heterofermentative inoculants on fermentation quality, nitrogen fractionation, nutritive value and aerobic stability of wilted alfalfa (*Medicago sativa* L) silage [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2014, 98(2): 290-299.
- [21] DONG J N, LI S Z, CHEN X, et al. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* inoculation on the quality and bacterial community of whole-crop corn silage at different harvest stages [J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2022, 9(1): 57.
- [22] LU Y X, LI P, BAI S Q, et al. Effect of phenyllactic acid on silage fermentation and bacterial community of reed canary grass on the Qinghai Tibetan Plateau [J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 83.
- [23] SI H Z, LIU H L, LI Z P, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* addition on fermentation, bacterial community and aerobic stability in lucerne silage [J]. Animal Production Science, 2018, 59(8): 1528-1536.
- [24] PARVIN S, NISHINO N. Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodesgrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Grassland Science, 2010, 56(1): 51-55.
- [25] DU Z M, SUN L, LIN Y L, et al. Using PacBio SMRT sequencing technology and metabolomics to explore the microbiota-metabolome interaction related to silage fermentation of woody plant [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 857431.
- [26] 常春, 卢强, 孙林, 等. 盐胁迫对苜蓿营养品质及附着微生物群落的影响 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(1): 439-449.
- CHANG C, LU Q, SUN L, et al. Effects of salt stress on nutritional quality and attached microbial community of alfalfa [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(1): 439-449. (in Chinese)
- [27] ZENG T R, LI X L, GUAN H, et al. Dynamic microbial diversity and fermentation quality of the mixed silage of corn and soybean grown in strip intercropping system [J]. Biore-source Technology, 2020, 313: 123655.
- [28] LI P, LU Y X, ZHAO M, et al. Effects of phenyllactic acid, lactic acid bacteria, and their mixture on fermentation characteristics and microbial community composition of timothy silage [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 743433.
- [29] HE Q, ZHOU W, CHEN X Y, et al. Chemical and bacterial composition of *Broussonetia papyrifera* leaves ensiled at two ensiling densities with or without *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 329: 129792.
- [30] LV H J, PIAN R Q, XING Y Q, et al. Effects of citric acid on fermentation characteristics and bacterial diversity of *Amomum villosum* silage [J]. Biore-source Technology, 2020, 307: 123290.
- [31] SEALE D R. Bacterial inoculants as silage additives [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1986, 61(15): 9-26.
- [32] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J, et al. PICRUST2: an improved and customizable approach

for metagenome inference [J/OL]. bioRxiv; bioRxiv 672295 [2023-11-01]. <https://doi.org/10.1101/672295>. DOI:10.1101/672295.

[33] BARBIERI F, LAGHI L, MONTANARI C, et al. Insights into the metabolomic diversity of *Latilactobacillus sakei* [J]. Foods, 2022, 11(3):477.

Effects of Different Lactic Acid Bacteria Additives on Silage Quality of Natural Pasture Grass Silage

ZHAO Muqier BAO Jian WANG Zhijun DU Shuai LIU Jianliang ZOU Yuqi
PAN Zeyu JIA Yushan GE Gentu*

(Key Laboratory of Forage Cultivation and the Processing and Highly Efficient Utilization of the Ministry of Agriculture, College of Grassland, Resources and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: In this study, the effects of different lactic acid bacteria additives on nutritional quality, fermentation quality and microbial diversity of natural pasture grass silage were evaluated to improve the silage quality of natural pasture grass silage. The natural pasture grass of meadow steppe was used as ensiling raw material, with five treatments of control (CK), and additions of *Limosilactobacillus fermentum* (LF), *Latilactobacillus graminis* (LG), *Latilactobacillus plantarum* (LP) and *Lentilactobacillus buchneri* (LB) treatments were set up with three replicates in each treatment, and the indicators related to nutritional quality, fermentation quality and bacterial community structure of silage samples were determined after 60 days of ensiling. The results showed that four lactic acid bacteria additives improved the fermentation quality of natural pasture grass silage and reduced the loss of nutritional components to different degrees compared with the CK treatment. The LG treatment had the lowest pH and the highest lactic acid content, the acetic acid and ammoniacal nitrogen contents of the LF and LB treatments were significantly higher than of the other treatments ($P<0.05$), and butyric acid was not detected in all treatments. LG treatment had the highest content of water-soluble carbohydrate, and neutral detergent fiber content of the LF and LG treatments was significantly lower than that of the other treatments ($P<0.05$). Based on high-throughput sequencing, it was found that the abundances of *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Limosilactobacillus fermentum* were higher in the lactic acid bacteria additive treatments, while the abundances of *Levilactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* was higher in the CK treatment, and there was also a certain proportion of undesirable bacteria. In summary, combined with the comprehensive evaluation of the indicators of nutritional quality, fermentation quality and bacterial diversity, the silage quality of natural pasture grass silage is the best when *Latilactobacillus graminis* is added. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(5):3352-3362]

Key words: natural pasture grass; lactic acid bacteria; silage quality; microbial diversity

* Corresponding author, professor, E-mail: gegentu@163.com