乳酸菌对青贮品质及草食家畜健康的影响

王天威^{1†}, 曹艳红^{2†}, 杨果^{3*}, 钟瑾^{1,4,5,6*}

1. 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101;

2. 广西壮族自治区畜牧研究所, 南宁 530001;

3. 中国科学院西北生态环境资源研究院, 兰州 730000;

4. 中国科学院大学, 北京 100101;

5. 中国科学院生态草业工程实验室, 呼伦贝尔 021000;

6. 中国科学院农业微生物先进技术重点实验室, 北京 100101

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhongj@im.ac.cn; yangguo@lzb.ac.cn

收稿日期: 2020-05-28; 接受日期: 2020-06-22; 网络版发表日期: 2020-09-04

广西重大科技专项(批准号: AA18118041)、公益性行业(农业)科研专项(批准号: 201503134)和中国科学院科技服务网络计划(STS计划, 批准号: KFJ-STIS-ZDTP-056)资助

摘要 青贮饲料是草食家畜最重要的粗饲料之一, 调制并生产优质青贮饲料对畜牧业的提质增效具有举足轻重的作用. 青贮饲料品质受牧草特性、本底微生物菌群结构和环境条件等因子的影响, 而乳酸菌作为青贮核心微生物及一种主要的青贮添加剂, 对青贮饲料的发酵品质及营养品质等的提升具有重要作用. 同时, 乳酸菌等微生物作为草食家畜胃肠道重要的益生菌, 不仅能影响草食家畜健康状况和生长性能, 还可协助宿主维持其免疫稳态. 本文围绕乳酸菌对青贮品质的影响以及其对草食家畜营养代谢、免疫应激等方面的作用机制进行了综述. 全面深入地理解乳酸菌这一类重要的微生物在青贮发酵过程中的生物学功能及其对青贮品质、草食家畜生理健康等方面的作用机制, 可为高效功能微生物青贮菌剂的研发、青贮品质的提升及草食家畜的生长性能与生理健康水平的提高提供科学依据.

关键词 乳酸菌, 青贮, 青贮品质, 草食家畜, 生长性能, 免疫机能, 肠道健康

随着人们对营养健康要求的不断提高, 居民对优质畜产品的需求日益增加. 然而, 传统粗放的种养方式中长期存在的牧草季节性供应不均、草产品加工工艺落后、草食家畜营养不良等问题, 严重制约着我国生态草牧业的可持续发展. 青贮饲料在草食家畜的日粮粗料中占比最重, 超过50%, 且该比例呈逐年增加的趋势^[1]. 因此, 调制优质青贮饲料对保障草食家畜日粮

粗料持续稳定供应具有重要意义. 青贮发酵过程包括多个阶段、多种微生物的参与, 且与牧草原料和环境等影响因子有密切关系, 若控制不当, 不仅会造成大量干物质(dry matter, DM)损失, 而且会产生霉变及毒素污染等问题, 严重影响下游畜牧产业的发展. 乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类能够利用碳水化合物代谢产生乳酸的细菌, 属于革兰氏阳性菌, 一般不形成

引用格式: 王天威, 曹艳红, 杨果, 等. 乳酸菌对青贮品质及草食家畜健康的影响. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 927-938

Wang T W, Cao Y H, Yang G, et al. Effects of lactic acid bacteria on the quality of silage and health of ruminants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 927-938, doi: 10.1360/SSV-2020-0039

孢子, 涉及乳球菌属(*Lactococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)等^[2], 它们在发酵初期快速降低青贮pH过程中发挥重要作用. 添加适宜的LAB添加剂可延长青贮保质期、减少DM损失、降低病原微生物数量, 提高牧草营养价值及适口性, 提升牧草安全性. LAB及其发酵的优质青贮饲料可显著增加草食家畜的采食量、DM消化率和生产性能, 同时还可减少瘤胃甲烷的产生^[3], 提高瘤胃微生物的生物量及挥发性脂肪酸的含量^[4]. 此外, 直接向草食家畜日粮中添加LAB等微生物能够调节胃肠道健康, 包括调节胃肠道内微生态的平衡、竞争抑制病原菌、防止瘤胃酸中毒、激活免疫系统^[5,6]. 然而LAB等微生物添加剂的食入剂量、频率以及草食家畜的生长阶段都会影响其使用效果^[7]. 因此, 阐明LAB添加剂与青贮品质和草食家畜消化及免疫机能之间的作用机制和调控网络, 可为研发高效功能微生物青贮菌剂提供思路, 为提升青贮品质、提高草食家畜生长性能和胃肠道健康提供科学依据.

1 LAB对青贮品质的影响

1.1 青贮原理及特点

青贮是一种青绿饲料贮藏技术. 该技术是将新鲜植物切断压实在窖、塔、裹包等贮存器中, 形成密闭厌氧的发酵环境, 由LAB将青贮原料中的可溶性碳水化合物(water soluble carbohydrates, WSC)转化成乳酸等有机酸, 从而降低pH, 抑制霉菌(mold)等有害微生物的活动, 达到长期贮存的目的^[8]. 青贮饲料不仅可以长久地保存并保留牧草及全株作物的绝大部分养分, 而且具有营养多汁、酸香适口等特点.

青贮发酵过程是多个阶段、多种微生物参与的复杂发酵过程(图1). 青贮发酵过程通常分为4个阶段^[9]: (i) 有氧发酵阶段(the initial aerobic phase). 青贮原料收获后, 部分植物细胞并未立即死亡, 仍然进行呼吸作用; 此外, 植物表面附着的酵母菌(yeast)、肠杆菌(*enterobacteria*)和醋酸菌(*Acetobacter*)等好氧微生物继续进行增殖代谢, 消耗氧气分解有机物质, 直至氧气消耗殆尽, 形成厌氧环境, 该阶段pH由6.5降至5.0左右. (ii) 厌氧发酵阶段(the fermentation phase). 厌氧环境形成后, LAB迅速增殖并形成优势菌群, 进行发酵, 代谢产

生大量乳酸, 导致pH降低, 当pH值下降到4.2时, 霉菌、腐败菌等不利微生物的活动受到明显抑制, 甚至停止. (iii) 稳定贮存阶段(the stable storage phase). 随着LAB数量的增加以及乳酸的积累, pH值继续降低, 大部分LAB基本停止活动, 营养物质消耗有限, 青贮可长久持续保存. (iv) 有氧暴露阶段(the feed-out phase). 由于开窖或取料后密封不严导致空气进入, 青贮饲料暴露于空气中, 导致酵母菌、霉菌、肠杆菌等好氧菌复苏、增殖, 消耗有机物质, 产生氨态氮、毒素等物质, 导致pH上升、温度升高, 青贮饲料腐败变质^[10].

1.2 青贮发酵品质的影响因子

虽然自20世纪50年代起, 青贮技术已在我国畜牧业中开始被广泛应用, 但实际的青贮效果往往不尽如人意. 青贮的品质和营养价值受许多生物学、环境及技术因素的影响, 只有使用适当的青贮技术才可有效控制青贮各个阶段的发酵效果, 进而获得高品质、安全、卫生的青贮. 具体来讲, 影响青贮发酵的因素包括原料的成熟度、切割长度、DM含量、粗蛋白(crude protein, CP)和WSC等关键营养成分的含量、缓冲能力(buffering capacity, BC; 即抗pH值变化的能力, 通常指改变1 kg DM的1个pH单位所需碱的mg当量)、表面附着微生物的种类与数量, 环境的温度、湿度、厌氧程度, 以及青贮装置的类型等^[11,12].

牧草及作物发酵能力的不同可影响青贮效果及品质. 发酵系数(fermentation coefficient, FC)通常被用来评估发酵能力, 其计算公式为 $FC = DM(\%) + 8WSC/BC$, 一般认为 $FC \geq 45$ 代表发酵能力较好, 从公式可看出原料本身的DM、WSC和BC都可影响发酵能力. WSC是青贮发酵的关键底物, 厌氧发酵阶段LAB利用WSC作为发酵底物, 产生大量乳酸, 降低pH. 研究表明, DM中的WSC含量高于5%是保障青贮发酵所必需的阈值. 通常情况下, 玉米和甜高粱等禾本科中WSC的含量较高, 容易青贮; 而苜蓿、饲用大豆等豆科牧草的WSC较低, 而CP含量较高, BC约为禾本科牧草的两倍, 因此不易青贮^[13~16].

发酵归根结底是多种微生物参与的活动, 不同微生物对青贮品质的贡献不同. LAB在青贮中多发挥积极作用. 牧草表面附着的足量LAB是优质青贮饲料发酵的必需条件之一, 当 $LAB < 10^5$ CFU/g鲜重(fresh

图 1 微生物对青贮及草食家畜生产性能和免疫功能的主要调节机制
Figure 1 The main regulatory mechanism of microorganisms on the silage quality as well as the performance and immune function of ruminants

weight, FM)时, LAB无法在微生物菌群中占据优势地位, 不能主导发酵, 因此难以获得较好的发酵效果^[17]. 酵母菌、芽孢杆菌(*Bacillus*)、肠杆菌、醋酸杆菌(*Acetobacter*)、霉菌、梭菌(*Clostridium*)等其他微生物多发挥负面作用. 酵母菌可以利用葡萄糖作为底物, 代谢产生乙醇和二氧化碳(CO₂), 造成48.9%的底物DM损失^[9]. 酵母菌通常在密封延迟或者开封(好氧变质初期)的情况下迅速增殖, 当酵母菌的数量高于10⁵ CFU/g FM时, 会导致青贮饲料降解, 尤其是可利用乳酸的酵母菌, 会引起青贮饲料pH的显著升高. 芽孢杆菌、肠杆菌和醋酸杆菌通常在有氧发酵阶段和二次发酵中期大量增殖, 这些微生物不仅会降解蛋白质、糖类等营养成分, 而且会产生热量, 引起温度的升高. pH和温度的升高为梭菌和霉菌的增殖创造了有利条件. 梭菌和霉菌通常以孢子形式存在于牧草表面, 或者是在收获时经由泥土带入青贮. 梭菌在厌氧状态下代谢乳酸产生丁酸、氨态氮、CO₂和氢气(H₂), 报道指出梭菌的大量增殖会造成高达51.1%的底物DM损失和18.4%的能量损失^[9]. 丁酸和氨态氮直接导致青贮营养品质下降, 影响适口性. 霉菌导致的青贮腐败影响最严重, 不仅使整体DM损失高达20%, 而且周边等容易接触氧气的部分DM损失高达70%^[9], 其代谢产生的毒素等有害产物(如黄曲霉毒素、T-2毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素等)会严重威胁草食家畜的健康, 对家畜的肝脏、肾脏、神经系统、造血组织等造成毒害^[18].

1.3 LAB添加剂对青贮品质的影响

青贮添加剂的目的是控制牧草保存过程, 以便在饲喂草食家畜时, 尽可能多地保留牧草的营养成分, 同时确保青贮发酵过程中以LAB占主导菌群, 从而代谢产生足量乳酸保证青贮品质. 宏基因组研究表明, 青贮发酵过程主要是由细菌驱动, 且发酵品质佳的青贮无一不是由LAB主导^[14,15,19,20]. 青贮添加剂可改善青贮营养成分, 加速启动发酵以减少贮存损失, 控制发酵程度以减少发酵损失, 延长有氧稳定性. Kung等人^[21]依据添加剂对青贮的影响将其分为5种类型: 发酵促进物(LAB培养物和碳源)、发酵抑制剂(酸类、甲醛等)、有氧腐败抑制剂(乙酸、丙酸等)、营养素(尿素和氨等)和吸收剂(麦麸、稻草等). 近年来, 由于认识到青贮添加剂对草食家畜的影响对于生产者更为重要, Muck等人^[22]从生产实践的角度将添加剂分为6类:

同型LAB、专性异型LAB、复合LAB接种物(包括专性异型LAB和同型LAB或兼性异型LAB)、其他接种物(非乳酸菌类)、化学添加剂和酶制剂. 由此可见, 随着人们对青贮添加剂认知的提升, 相比于化学制剂, 微生物尤其是LAB添加剂在实际生产应用中占据了更为重要的位置.

(1) 同型LAB对青贮品质的影响. 同型LAB在青贮发酵过程中以葡萄糖为底物, 经糖酵解途径产生唯一产物乳酸, 几乎不会造成DM损失, 因此, 同型LAB是青贮中应用最为广泛的接种剂. 嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、香肠乳杆菌(*L. farciminis*)、乳酸乳杆菌(*L. lactis*)和牛乳杆菌(*L. bovis*)为专性同型LAB. 实际上, 大多数同型LAB在分类学上被认为是兼性异型发酵菌种, 而非专性同型发酵菌种, 比如植物乳杆菌(*L. plantarum*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、屎肠球菌(*E. faecium*)和部分片球菌种(如乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)和戊糖片球菌(*P. pentacaceus*)). 兼性异型LAB与专性同型LAB发酵己糖(如葡萄糖)的产物都是乳酸, 二者不同之处在于前者具有磷酸转酮酶, 该酶允许兼性异型LAB发酵戊糖产生乳酸和乙酸^[23]. 牧草接种同型LAB后通常比对照组具有较低的pH、乙酸、丁酸和氨态氮含量, 较高的乳酸含量, 同时具有较高的DM回收率^[23]. 当然, 接种物的青贮效果因牧草而异, 比如在降低pH方面, 同型LAB对温、热带牧草和苜蓿等其他豆科牧草效果明显, 对玉米、甜高粱和甘蔗尾叶效果并不显著^[22]. 有近1/3的文献表明, 同型LAB导致青贮有氧稳定性降低^[22], 一方面可能是由于同型LAB产生的乳酸为酵母菌利用, 而以乳酸为碳源的酵母菌很可能是启动有氧腐败的罪魁祸首^[23,24]; 另一方面可能是由于乙酸积累量不足, 而乙酸是抑制酵母生长的关键物质^[11]. 然而, 有研究表明, 植物乳杆菌代谢产物3-苯乳酸(3-phenyllactic acid)和3-羟基癸酸(3-hydroxydecanoic acid)对异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigates*)、罗克福尔青霉菌(*Penicillium roquefort*)具有抑制作用, 可维持青贮有氧稳定性^[25]. 因此, 同型LAB对青贮有氧稳定性的影响值得进一步深入研究.

(2) 异型LAB对青贮品质的影响. 一般情况下, 异型LAB在青贮过程中的产酸速率慢于同型LAB, 但在有氧暴露阶段异型LAB有助于延长青贮的有氧稳定

性. 异型LAB代谢产物除乳酸外还包括乙酸、乙醇和CO₂, 因此它们延长有氧稳定性的代价是DM损失. 青贮中添加的异型LAB主要来自乳杆菌属、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和魏斯氏菌属等, 其中乳杆菌属分为4个群组, 即布氏乳杆菌(*L. buchneri*)组、植物乳杆菌组、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)组和干酪乳杆菌组. 布氏乳杆菌组中布氏乳杆菌最为常用, 其次是短乳杆菌(*L. brevis*)、希氏乳杆菌(*L. hilgardii*)和类谷糠乳杆菌(*L. parafarraginis*)等. 布氏乳杆菌代谢产生乙酸和1,2-丙二醇, 对酵母菌具有抑制作用, 该代谢通路并非经典的磷酸酮醇酶途径, 而是在厌氧条件下通过转化乳酸得到的^[26,27]. Zielińska等人^[28]研究表明, 布氏乳杆菌也可代谢1,2-丙二醇, 产生丙酸, 对有氧稳定性也起到一定促进作用. 布氏乳杆菌提高有氧稳定性的效果具有菌株特异性和剂量依赖性, 通常添加量在 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ CFU/g FM即可提高青贮有氧稳定性^[22]. 然而布氏乳杆菌也有其不足之处, 首先是生长速度慢, 布氏乳杆菌需要在厌氧条件下生长30~60天才能有效改善青贮有氧稳定性^[22]; 其次是异型发酵产生大量的乙酸、丙酸会导致青贮饲料能量损失过大, 适口性降低. 其他异型LAB也可提高有氧稳定性, 如短乳杆菌, 但是文献报道, 短乳杆菌只有在添加量高达 7×10^8 CFU/g FM时才可提高有氧稳定性^[29], 因此实用性不强. 当然青贮效果与菌株差异也有一定关系, 近年来许多研究发现, 希氏乳杆菌可消耗较少的DM产生乙酸、1,2-丙二醇、苯乳酸和对羟基苯甲酸(4-hydroxydecanoic)等抗真菌物质, 有效提高甘蔗尾叶和玉米青贮的有氧稳定性^[30,31]. Liu等人^[32]研究表明, 类谷糠乳杆菌在较低的贮存温度维持有氧稳定性的能力优于布氏乳杆菌. 因此, 异型LAB代谢产生的其他抗真菌物质, 如苯甲酸(benzoic acid)、邻苯二酚(catechol)、氢化肉桂酸(hydrocinnamic acid)、水杨酸(salicylic acid)和苯乳酸等, 可能与乙酸协同作用改善有氧稳定性. 然而, 添加的异型LAB是否随着发酵时间的延长逐步占据主导地位或者促进异型LAB生长增殖还需要深入探究.

(3) 特定功能LAB添加剂对青贮品质的影响. 特定功能LAB, 无论是天然筛选菌株还是诱变菌株亦或是工程菌株^[33~39], 通常具备较高的生长增殖能力、宽泛的糖源利用能力、产酸和耐酸能力、耐低温或高温能力、较强的抑菌能力、脱毒能力以及木质素和纤维素降解能力等特点的一种或几种, 使得它们在提升青贮

品质时效果显著.

LAB的生长增殖能力、糖原利用能力和产酸能力, 对于青贮初期快速利用底物增殖占据优势地位并产生足量乳酸降低青贮pH具有重要作用. Ni等人^[14]研究表明, 由植物乳杆菌和戊糖片球菌组成的复合LAB能够促进饲用大豆青贮中LAB的快速增殖, 产生更多乳酸, 快速降低pH. 耐酸能力使LAB在青贮发酵的稳定阶段保持活力, 从而利于青贮长期保存. 添加LAB的青贮在发酵后期(青贮60天), 乳杆菌属占主导地位, 其相对丰度高于80%, 有助于青贮品质的长期保存^[14,16]. 耐低温或高温LAB主要适应不同地域气候, 如张红梅等人^[36]从青藏高原高寒地区分离的戊糖片球菌、棒状乳杆菌(*L. coryniformis*)和清酒乳杆菌(*L. sakei*)在低温(15℃)下青贮垂穗披碱草的效果优于室温(25℃); 关皓等人^[40]从西南高温高湿地区分离的唾液乳杆菌(*L. salivarius*)和鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)能够在45℃生长良好, 可能更利于青贮高温地区生长的象草. LAB除产生有机酸外还能产生过细菌素等活性物质, 比如Ström等人^[41]发现, 植物乳杆菌产生的环二肽具有抑制真菌作用; Amado等人^[42]研究发现, 产细菌素pediocin SA-1的乳酸片球菌能够有效降低玉米青贮中李斯特菌(*Listeria*)的数量, 延长有氧稳定性; Marciňáková等人^[43]报道了产细菌素屎肠球菌(*E. faecium*)显著减少了偃麦草青贮中的李斯特菌和霉菌数量, 维持了偃麦草青贮pH的稳定. 部分功能LAB能够分泌阿魏酸酯酶(feruloyl esterase, FAE), 该酶有助于打开牧草细胞壁中阿魏酸等酚类木质素分子与半纤维素分子的酯键, 破坏致密网状交联结构, 释放酚类物质, 增加微生物分泌的纤维素酶、木聚糖酶等对纤维素和半纤维素的有效酶解^[34]. Kang等人^[20]研究表明, 产FAE的布氏乳杆菌能增加玉米青贮细胞壁的消化率, 提高中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)消化率. 上述功能LAB或是通过天然筛选或是经过诱变筛选获得, 它们对于提升青贮品质的效果毋庸置疑, 然而LAB并非是全能的, 因为有些特殊功能基因本来就不存在于LAB中, 比如纤维素酶基因等.

随着转基因技术的发展, 科学家们通过将真菌中的特殊功能基因在LAB中表达以获得具有特殊功能的LAB工程菌株. 比如, Liu等人^[35]将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的纤维素酶基因转移至乳酸乳杆菌(*Lactococcus lactis*)中, 增加了其对苜蓿木质纤维素

的降解能力. Liu等人^[39]通过表面展示技术将源于麦氏喙枝孢霉(*Rhinochladiella mackenziei*)的lactonohydrolase在罗伊氏乳杆菌中表达, 该酶有助于降解玉米中的玉米赤霉烯酮, 从而达到脱毒效果. 虽然工程菌株容易获得且效果显著, 但在实际应用中需要考虑生物安全等因素.

(4) 复合LAB对青贮品质的影响. 考虑到青贮原料的差异和菌株发酵特点及性能的不同, 通常添加复合LAB调制青贮. 不同种属的LAB在青贮发酵过程中的表现不同, 一般情况下, 肠球菌属生长速率较快, 其次是片球菌属, 最后是乳杆菌属^[4]. 与乳酸杆菌相比, 片球菌对高DM含量的青贮原料具有更高的耐受性, 并且其最佳生长温度和pH值范围更广, 因此不同种类的LAB能发挥协同作用. 兼性异型LAB(如屎肠球菌、戊糖片球菌)主导青贮发酵初期, 迅速产酸, 降低pH, 抑制肠杆菌、梭菌和其他不利微生物, 从而降低蛋白质的水解和DM损失; 同型LAB(如嗜酸乳杆菌、香肠乳杆菌)具有较强的耐酸性, 有利于在发酵后期进一步创造酸性环境, 维持发酵稳态; 专性异型LAB(如布氏乳杆菌、希氏乳杆菌)虽然生长速率和转化乙酸的效率较缓, 但可在开封后持续维持有氧稳定性. Driehuis等人^[44]研究发现, 布氏乳杆菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌组合接种剂可降低黑麦草青贮中氨态氮的含量, 减少酵母菌数量, 提高有氧稳定性. 而Adesogan和Salawu^[45]研究发现, 与对照组相比, 商业菌剂(包含布氏乳杆菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌)并没有显著延长豌豆和小麦混合青贮的有氧稳定性, 这表明复合菌剂的效果因作物种类和菌株类别而异. 通常禾本科牧草WSC含量高, 容易青贮, 若添加产酸且耐酸强的LAB会导致过度发酵, 因此考虑添加产酸适中LAB来避免过酸化; 豆科牧草WSC含量低, 可通过添加有助于纤维降解的LAB以提高发酵底物含量, 提高青贮品质^[16]. 虽然研究表明, 添加到全株玉米青贮的植物乳杆菌和戊糖片球菌能在发酵初期快速增殖, 并且可以持续占据主导地位(未发表数据), 但是关于多种不同发酵类型的LAB之间的相互作用及其代谢接力情况方面的研究尚属空白, 因此, 从微生物组和代谢组等组学的角度研究青贮发酵后期异型LAB利用青贮发酵前期同型LAB代谢的乳酸产生乙酸(有助于提高有氧稳定性)的酶等关键因子是今后的研究方向.

2 LAB对草食家畜的影响

2.1 LAB对草食家畜的生长性能影响

LAB不仅可以作为青贮饲料添加剂为草食家畜的日粮提供有力保障, 还可作为饲喂益生菌参与调节胃肠道稳态、营养代谢和免疫系统等. 目前, 对益生菌在草食家畜中应用的大多数研究集中于参与乳酸代谢的益生菌群, 例如反刍月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)、埃尔氏巨球藻(*Megasphaera elsdenii*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)^[46-48]; 另一类是瘤胃纤维降解菌, 包括白色瘤胃球菌属(*Ruminococcus albus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*), 目的是增强草食家畜纤维消化能力^[48,49]. 从逻辑上讲, 瘤胃源益生菌可能更适应本底微生物菌群. 在草食家畜实际生产中, 使用的益生菌多为LAB, 包括肠球菌、链球菌、乳杆菌和片球菌, 它们几乎被应用于所有类型的牲畜^[50]. 在乳牛犊中, LAB以丸剂形式饲喂, 而在奶牛和肉牛动物中, 它们则与日粮混合饲喂. 此外, 如前所述, LAB也被应用在青贮过程中, 以延长青贮饲料的保存时间, 增加饲料价值和有氧稳定性^[51]. 由于LAB是公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的添加剂且可通过多种机制调节消化道微生态环境^[5], 因此被广泛应用于草食家畜生产实践中. LAB产生的乳酸可降低环境pH, 抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)等pH敏感的病原菌种; LAB产生的细菌素, 如乳链菌肽(nisin)、唾液菌素(salivaricin)等抗菌活性物质可杀死革兰氏阳性病原菌^[52]; LAB产生的其他活性物质, 如甲羟戊酸内酯(mevalonolactone)、苯甲酸(benzoic acid)、双乙酰基(diacetyl)、罗氏菌素(reuterin)和甲基乙内酰脲(methylhydantoin)等也具有一定的抑菌功能^[53]. 有研究指出, LAB与酵母等复合微生物制剂在饲喂草食家畜时表现出协同作用^[50]. LAB在草食家畜体内或通过瘤胃起作用, 或通过肠道起作用, 其作用方式也受到多因素共同影响, 包括食入剂量、进食时间、持续时间、频率和环境应激等^[7]. 因此, LAB在不同发育阶段的草食家畜中具有不同的使用效果.

(1) LAB对幼龄草食家畜的作用. 幼龄与成年草食家畜在消化能力方面的主要区别在于, 幼龄草食家畜主要通过肠道消化大量日粮营养素, 较易导致有害微生物增殖, 从而增加腹泻、体重减轻等方面的风险. 研究证实, 草食家畜摄入LAB对肠道功能具有正向调

节作用^[54,55]。在奶牛生产上, 加速幼龄奶牛建立瘤胃和肠道健康微生物的优势菌群, 减少导致腹泻的肠病原菌比例是使犊牛快速适应固体饲料的重要生产目标之一。Cruywagen等人^[56]发现, 在荷斯坦犊牛的饲料中添加嗜酸乳杆菌, 可显著改善其生长性能, 增强其反刍能力, 这表明嗜酸乳杆菌可能具有促进瘤胃发育的功能。Adams等人^[57]发现, 詹氏丙酸杆菌(*Propionibacterium jensenii*)对断奶前和断奶期间的犊牛生长性能具有显著的正向影响。Frizzo等人^[58]通过用代乳料和喷雾干燥后的乳清粉饲喂犊牛, 评估LAB对犊牛生长等性能的影响, 结果发现, 饲喂LAB可显著增加犊牛的日增重、每周饲料摄入量(total feed intake)和开口料摄入量(starter intake), 降低粪便指数, 表明LAB的摄入能够降低犊牛腹泻发生率。目前许多研究证实, LAB的摄入能够降低幼龄草食家畜的腹泻发生率^[56], 比如嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌组合可显著降低犊牛腹泻发生率^[55]。

(2) LAB对成年草食家畜的作用。维持瘤胃和肠道微生态的稳定是泌乳初期高产母牛保健的重点, 因为这些母牛长期处于能量负平衡状态, 且其饮食中的大量可发酵碳水化合物可能导致酸中毒。在产犊前三周到产犊后三周期间, 产犊压力和饲料结构的改变(需发酵更多的碳水化合物)以及泌乳等因素, 常导致奶牛出现代谢紊乱, 如亚急性酸中毒^[59,60]。在这种情况下, 添加LAB能够通过提高草食家畜干物质采食量(dry matter intake, DMI)、产奶量和乳蛋白含量, 以及产前和/或产后的血糖和胰岛素水平, 以提高奶牛的生产能力^[61]。

在肉牛和肉羊育肥饲养中, 养殖场使用高度可发酵饲料的量与群体瘤胃酸中毒的概率显著相关^[48]。实验证实, 饲喂LAB的肉牛具有更高的生长性能、产肉量和饲料效率^[62]。LAB也被证实对减轻成年育肥牛的环境应激效应具有重要作用。养殖场新移入犊牛易受到各种环境应激(如断奶、牵引和脱角等应激因素)的影响, 常会引起瘤胃和肠道微生物菌群发生变化, 从而导致生产性能下降, 甚至死亡^[63]。LAB对肠道微生物菌群有重要的调控作用, Krehbiel等人^[62]发现, 新生犊牛被灌服复合LAB(包括屎肠球菌、嗜酸乳杆菌、嗜热双歧杆菌(*Bifidobacterium thermophilum*)和长双歧杆菌(*B. longum*))后, 比对照组具有更短的抗菌期。Ohya等人^[64,65]发现, 摄入LAB能够降低反刍动物粪便梭菌

数量并显著提升乳脂中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)和非脂固体(solids not fat, SNF)等组成。青贮中的LAB也可改善犊牛的应激反应与健康状况, 从而提升其生产性能。研究发现, 用LAB或LAB发酵日粮可有效提高肉牛饲料效率和日增重^[66]。根据Krehbiel等人^[62]的研究, 饲喂LAB能够使育肥牛日增重增加2.5%~5%, 饲料效率提高约2%, 胴体量增加6~7 kg。

LAB在育肥牛身上的另一个作用是降低肠道中致病性大肠杆菌的浓度。大肠杆菌O157:H7是产生志贺毒素的食源性病原菌, 可引起人类出血性结肠炎和溶血性尿毒症综合征^[67]。大肠杆菌O157:H7在饲养场中比较常见, 育肥牛是其主要宿主之一, 大肠杆菌O157:H7可随牛的粪便排出体外, 增加传播途径。研究发现, 施用LAB可以有效减少育肥牛粪便中大肠杆菌O157:H7的数量, 并可以通过补充LAB来降低大肠杆菌O157:H7的发生率^[68]。Ohya等人^[65]发现, LAB能够有效消除荷斯坦牛犊中大肠杆菌O157:H7。

2.2 LAB对草食家畜营养代谢和免疫机能的调控

在瘤胃内部, LAB主要通过促进瘤胃微生物的代谢防止草食家畜瘤胃酸中毒, 比如反刍月形单胞菌可将乳酸代谢为其他挥发性脂肪酸^[6,48]。瘤胃pH主要取决于乳酸的浓度^[69]。乳酸利用菌(lactic acid utilizing bacteria, LUB)可通过降低乳酸浓度使pH保持在正常水平, 比如埃氏巨型球菌(*Megasphaera elsdeni*)在瘤胃中不仅能同时利用乳酸、葡萄糖和麦芽糖, 还可与LAB竞争底物^[70]。饲喂精料的草食家畜瘤胃中存在大量丙酸杆菌(*Propionibacterium*), 它们能通过将乳酸转化为丙酸酯的方式调节瘤胃微环境(图1), 并在肝脏内生产更多的葡萄糖^[71], 从而为机体的新陈代谢与生长供能。

LAB具有调节宿主免疫功能的能力。在草食家畜胃肠道中, 除上皮细胞外, 还存在各种免疫细胞, 如树突状细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞以及聚集在派尔集合淋巴结、固有层和上皮内区域的T和B淋巴细胞^[61]。LAB随饲料进入肠道后, 被肠上皮细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞或树突状细胞吞噬, 刺激免疫反应(图1)。Matsuguchi等人^[72]报道, 干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌等参与激活巨噬细胞, 从而产生细胞因子(cytokines), 比如肿瘤坏死因子(tumor necrosis

factor- α , TNF- α). 机体摄入LAB后, 免疫细胞被迅速激活, 从而导致吞噬作用增强以及大量体液介质的产生^[73], 其中, 白介素(interleukin, IL)-1、IL-6、TNF- α 、干扰素(interferons, IFN)、活性氧/氮中间体(reactive oxygen/nitrogen intermediates)和抗菌肽(antimicrobial peptides)是最早产生的体液介质, 它们共同作用为宿主提供即时保护并诱导特定的免疫反应. 在微生物感染过程中后期产生的细胞因子直接响应细胞介导的1型T辅助免疫(T helper type 1, Th1)或体液T辅助2型免疫应答(Th2). IL-2和IL-12可促进天然T细胞中Th1细胞的发育, 而IL-4、IL-10和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)则会抑制TNF α , IL-1, IL-6, IL-12和IFN- γ , 从而增强Th2诱导的免疫应答^[74]. LAB已被证实会促进先天免疫反应增强(即增强吞噬作用和自然杀伤细胞活性), 以及动物体内免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)A的增加和IgE的减少^[75]. 许多LAB都可激活巨噬细胞以产生刺激免疫反应的细胞因子. Seo等人^[76]发现, 干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌能够刺激巨噬细胞分泌TNF- α 并促进调节性树突状细胞的发育. 据报道, LAB可改变草食家畜肠道微生物的平衡, 黏附于肠黏膜并防止病原体黏附或激活, 影响肠道通透性并调节免疫功能. 研究也发现, 某些LAB在宿主感染致病菌后可通过刺激特异性抗体应答而显示出佐剂性^[76].

然而, 根据不同研究结果, LAB对细胞因子的产生以及T细胞和B细胞反应的影响效果不一致, 可能是由于LAB的效用取决于使用剂量、施用方式和持续时间, 以及不同组织和细胞类型. 鼠李糖乳杆菌和保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)能够强烈诱导产生IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α 和Th1-促进细胞因子(IL-12, IL-18和IFN- γ), 但不诱导产生Th2-促进外周血单核细胞中的细胞因子IL-4^[77]. 嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)组合未影响派尔集合淋巴结、脾脏或淋巴结中IL-6, TNF- α 和IFN- γ 的基因表达^[78]. LAB具有极低的促炎反应诱导作用, 但更倾向于在肠上皮细胞系中诱导TGF- β ^[79]. 此外, 某些LAB具有一定的免疫调节作用. 研究显示, 罗伊氏乳杆菌可能抑制干酪乳杆菌诱导的树突状细胞内IL-6, IL12和TNF- α 的生成^[80]. 这些结果表明, 在实际应用中,

LAB的菌株特异性和施用量也应当被考虑在内.

3 总结与展望

青贮过程属于多阶段发酵、多种微生物参与的复杂过程. LAB的添加不仅可以保存牧草的营养成分, 提高适口性, 还能够增加草食家畜的DMI, 进而提高生长性能和生产性能. 考虑到不同牧草原料的水分、营养成分和BC等特性, 需要添加不同类型和/或不同功能的LAB, 以提升青贮品质. 尤其, 功能菌株的研究一定是基于菌株水平, 深入了解及阐明其生理代谢特点及功能机制是其应用的前提. 另一方面, 目前常用的LAB多属于乳杆菌、片球菌及肠球菌等, 而对于它们在青贮过程中造成的DM及能量损失、微生物菌群的动态变化过程、代谢物质转化利用及代谢接力过程等机制方面的研究也尚不深入, 因此, 需要结合宏基因组、代谢组等微生物组手段进行深入研究, 为研发更低损、更高效、更安全的功能复合微生物青贮菌剂奠定理论基础.

目前LAB在草食家畜生产中的功能研究主要集中在瘤胃-肠道微生态环境(pH值、微生物菌群结构等), 以及其对草食家畜代谢性酸中毒等症状的调节作用. LAB对草食家畜的营养和健康调节主要取决于饲喂的LAB种类、草食家畜的品种、不同发育阶段等因素的影响. 考虑到LAB具有调节瘤胃-肠道微生态系统的特征, 未来可以研发补充丙酸杆菌的LAB复合型产品, 并针对不同用途、不同阶段草食家畜开发更具有针对性的LAB系列青贮添加剂产品. 另外, 乳杆菌产生的乳酸对甲烷产生的抑制作用可以促进丙酸杆菌产生丙酸酯, 并提高瘤胃的能量效率, 从而改善动物的生产性能. 目前已证明, 饲喂LAB能够提高奶牛的产奶量, 降低新断奶犊牛和/或饲养场新接犊牛的发病率, 并提高日增重和胴体重. 然而, 目前对LAB在草食家畜中的作用机制尚未完全了解, 其黏附、定植、抑制作用和免疫功能刺激的分子机制, 以及LAB对宿主营养-宿主遗传-瘤胃微生物三者以及之间的互作调节机制仍不明晰, 因此, 需要更多的研究来明确LAB对宿主的综合调控分子机制, 使LAB能更有效地为草食家畜的生产实践服务.

参考文献

- 1 Holstein Grass. Statistical Yearbook of Grass in China (in Chinese). Beijing: Holstein, 2013. 5-20 [荷兰牧草. 中国草业统计年鉴. 北京: 荷兰]

- 坦, 2013. 5–20]
- 2 Chen W. Science and Technology of Lactic Acid Bacteria (in Chinese). Beijing: Science Press, 2018 [陈卫. 乳酸菌科学与技术. 北京: 科学出版社, 2018]
- 3 Doyle N, Mbandlwa P, Kelly W J, et al. Use of lactic acid bacteria to reduce methane production in ruminants, a critical review. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2207
- 4 Muck R. Recent advances in silage microbiology. *Agric Food Sci*, 2013, 22: 3–15
- 5 Wang T W, Teng K L, Liu G, et al. The functions and mechanisms of microecological agents in weaning piglet intestine (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 97–107 [王天威, 滕坤玲, 刘刚, 等. 微生态制剂对断奶仔猪肠道健康的影响及作用机制. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 97–107]
- 6 Nocek J E, Kautz W P, Leedle J A Z, et al. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 429–433
- 7 Puniya A K, Salem A Z M, Kumar S, et al. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. *J Integr Agric*, 2015, 14: 550–560
- 8 Zhong J, Ni K, Yang J, et al. The present situation and prospect of the processing technology of forage grass in China. *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 1677–1685
- 9 Borreani G, Tabacco E, Schmidt R J, et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 3952–3979
- 10 Wilkinson J M, Davies D R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass Forage Sci*, 2013, 68: 1–19
- 11 Yitbarek M B, Tamir B. Silage additives: review. *Open J Appl Sci*, 2014, 04: 258–274
- 12 Gao L C, Lin J S. The quality and effects of nature silage and inoculated silage on ruminant animal performance (in Chinese). *China Dairy Cattle*, 2017, 6: 17–20 [高笠宸, 林金生. 乳酸菌青贮与自然青贮的质量及其对反刍动物的影响. 中国奶牛, 2017, 6: 17–20]
- 13 Wang L, Sun Q Z. The influence of mixed ratio on alfalfa and whole-plant corn mixtures silage (in Chinese). In: The 3rd China Alfalfa Development Conference. Beijing, 2010 [王林, 孙启忠. 混贮比例对苜蓿与玉米混贮的影响. 见: 第三届中国苜蓿发展大会. 北京. 2010]
- 14 Ni K, Wang F, Zhu B, et al. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresour Technol*, 2017, 238: 706–715
- 15 Ni K, Zhao J, Zhu B, et al. Assessing the fermentation quality and microbial community of the mixed silage of forage soybean with crop corn or sorghum. *Bioresource Tech*, 2018, 265: 563–567
- 16 Su R, Ni K, Wang T, et al. Effects of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus fermentum* and cellulase additives on the fermentation quality and microbial community of alfalfa silage. *PeerJ*, 2019, 7: e7712
- 17 Kaiser E, Weiss K. Fermentation process during the ensiling of green forage low in nitrate. 2. Fermentation process after supplementation of nitrate, nitrite, lactic acid bacteria and formic acid. *Arch Tierernahr*, 1997, 50: 187–200
- 18 Peles F, Sipos P, Györi Z, et al. Adverse effects, transformation and channeling of aflatoxins into food raw materials in livestock. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2861
- 19 McAllister T A, Dunière L, Drouin P, et al. Silage review: using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 4060–4074
- 20 Kang T W, Adesogan A T, Kim S C, et al. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 732–738
- 21 Kung L Jr, Stokes M R, Lin C J. Silage additives. In: Buxton D R, Muck R E, Harrison J H, eds. *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy, Inc., 2003
- 22 Muck R E, Nadeau E M G, McAllister T A, et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 3980–4000
- 23 Pahlow G, Muck R E, Driehuis F, et al. Microbiology of ensiling. In: Buxton D R, Muck R E, Harrison J H, eds. *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy, Inc., 2003
- 24 Wang T, Teng K, Cao Y, et al. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 60TS-2, with or without homofermentative *Lactobacillus plantarum* B90, on the aerobic stability, fermentation quality and microbial community dynamics in sugarcane top silage. *Bioresour Technol*, 2020, 312: 123600
- 25 Broberg A, Jacobsson K, Strom K, et al. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 5547–5552

- 26 Oude Elferink S J W H, Krooneman J, Gottschal J C, et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 125–132
- 27 Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, et al. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 282–287
- 28 Zielińska K, Fabiszewska A, Świątek M, et al. Evaluation of the ability to metabolize 1,2-propanediol by heterofermentative bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Electron J Biotech*, 2017, 26: 60–63
- 29 Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 562–567
- 30 Santos W P, Ávila C L S, Pereira M N, et al. Effect of the inoculation of sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding behavior and milk yield of dairy cows. *J Anim Sci*, 2017, 95: 4613–4622
- 31 Reis C B, de Oliveira dos Santos A, Carvalho B F, et al. Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and aerobic stability of corn silage. *J Appl Anim Res*, 2017, 46: 632–638
- 32 Liu Q H, Yang F Y, Zhang J G, et al. Characteristics of *Lactobacillus parafarraginis* ZH1 and its role in improving the aerobic stability of silages. *J Appl Microbiol*, 2014, 117: 405–416
- 33 Zhang H M, Duan Z, Li X, et al. Actual research and application of the silage lactic acid bacteria additives (in Chinese). *Pratac Sci*, 2017, 34: 2575–2583 [张红梅, 段珍, 李霞, 等. 青贮饲料乳酸菌添加剂的应用现状. 草业科学, 2017, 34: 2575–2583]
- 34 Xu Z, He H, Zhang S, et al. Characterization of feruloyl esterases produced by the four *Lactobacillus* species: *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. farciminis* and *L. fermentum*, isolated from ensiled corn stover. *Front Microbiol*, 2017, 8: 941
- 35 Liu Q, Li J, Zhao J, et al. Enhancement of lignocellulosic degradation in high-moisture alfalfa via anaerobic bioprocess of engineered *Lactococcus lactis* with the function of secreting cellulase. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 88
- 36 Zhang H M. The fermentation properties of ensiled *Elymus nutans* from different altitude regions on the Tibetan plateau and screening of lactic acid bacteria for low temperature fermentation (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Lanzhou: Lanzhou University, 2016 [张红梅. 青藏高原不同海拔区垂穗披碱草发酵特性及耐低温乳酸菌筛选研究. 硕士学位论文. 兰州: 兰州大学, 2016]
- 37 Yin X. Isolation, screening and application of lactic acid bacteria for inhibition of *Aspergillus flavus* in silage (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Alaer: Tarim University, 2018 [尹雪. 抑制青贮饲料中黄曲霉菌的乳酸菌分离筛选及应用. 硕士学位论文. 阿拉尔: 塔里木大学, 2018]
- 38 Cui G Y. Screening of thermotolerant lactic acid bacteria and application (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Xi'an: Northwest University, 2007 [崔国艳. 耐高温乳酸菌的选育及应用研究. 硕士学位论文. 西安: 西北大学, 2007]
- 39 Liu F, Malaphan W, Xing F, et al. Biodetoxification of fungal mycotoxins zearalenone by engineered probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* with surface-displayed lactonohydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 8813–8824
- 40 Guan H, Zeng T R, Shuai Y, et al. Natural lactic acid bacterial community and screening of high-quality lactic acid bacteria in silage in southwest China (in Chinese). *Pratac Sci*, 2019, 36: 3203–3213 [关皓, 曾泰儒, 帅杨, 等. 西南高温高湿地区青贮中天然乳酸菌群落结构特征及优质乳酸菌的筛选. 草业科学, 2019, 36: 3203–3213]
- 41 Ström K, Sjögren J, Broberg A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 4322–4327
- 42 Amado I R, Fuciños C, Fajardo P, et al. Pediocin SA-1: A selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 8070–8080
- 43 Marciňáková M, Lauková A, Simonová M, et al. A new probiotic and bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. *Czech J Anim Sci*, 2008, 53: 335–344
- 44 Driehuis F, Oude Elferink S J W H, Van Wikselaar P G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci*, 2001, 56: 330–343
- 45 Adesogan A T, Salawu M B. Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *J Sci Food Agric*, 2004, 84: 983–992
- 46 Klieve A V, Hennessy D, Ouwkerk D, et al. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J Appl Microbiol*, 2003, 95: 621–630
- 47 Raeth-Knight M L, Linn J G, Jung H G. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 1802–1809

- 48 Krause K M, Oetzel G R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Tech*, 2006, 126: 215–236
- 49 Chiquette J, Talbot G, Markwell F, et al. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus flavefaciens* NJ along with a probiotic mixture in forage or concentrate-fed dairy cows: Effect on ruminal fermentation, cellulolytic populations and in sacco digestibility. *Can J Anim Sci*, 2007, 87: 237–249
- 50 McAllister T A, Beauchemin K A, Alazzez A Y, et al. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can J Anim Sci*, 2011, 91: 193–211
- 51 Schmidt R J, Hu W, Mills J A, et al. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 5005–5010
- 52 Servin A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28: 405–440
- 53 Brashears M M, Amezquita A, Jaroni D. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Salt Lake City: Academic Press, 2005. 1–31
- 54 Kung L. Direct-fed microbials for dairy cows and enzymes for lactating dairy cows. *New Theor Appl*, 2001
- 55 Abu-Tarboush H M, Al-Saiady M Y, Keir El-Din A H. Evaluation of diet containing *Lactobacilli* on performance, fecal coliform, and *Lactobacilli* of young dairy calves. *Anim Feed Sci Tech*, 1996, 57: 39–49
- 56 Cruywagen C W, Jordaan I, Venter L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J Dairy Sci*, 1996, 79: 483–486
- 57 Adams M C, Luo J, Rayward D, et al. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Anim Feed Sci Tech*, 2008, 145: 41–52
- 58 Frizzo L S, Soto L P, Zbrun M V, et al. Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *anim Feed Sci Tech*, 2010, 157: 159–167
- 59 Oetzel G R, Emery K M, Kautz W P, et al. Direct-Fed microbial supplementation and health and performance of pre- and postpartum dairy cattle: a field trial. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 2058–2068
- 60 Chiquette J, Allison M J, Rasmussen M A. *Prevotella bryantii* 25A Used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J Dairy Sci*, 2008, 91: 3536–3543
- 61 Nocek J E, Kautz W P, Leedle J A Z, et al. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 331–335
- 62 Krehbiel C R, Rust S R, Zhang G, et al. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *J Anim Sci*, 2003, 81: E120–E132
- 63 Željko M, Tomislav M, Boris H, et al. Influence of live yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation to the diet of fattening lambs on growth performance and rumen bacterial number. *Veterinarski Arhiv*, 2010. 80: 695–703
- 64 Huck G L, Kreikemeier K K, Bolsen K K. Effect of reconstituting field-dried and early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. *J Anim Sci*, 1999, 77: 1074
- 65 Ohya T, Marubashi T, Ito H. Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157 from calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. *J Vet Med Sci*, 2000, 62: 1151–1155
- 66 Elam N A, Gleghorn J F, Rivera J D, et al. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J Anim Sci*, 2003, 81: 2686–2698
- 67 Ogunade I M, Kim D H, Jiang Y, et al. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 4427–4436
- 68 Stanford K, Bach S, Baah J, et al. A mixture of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, and *Paenibacillus polymyxa* reduces *Escherichia coli* O157:H7 in finishing feedlot cattle. *J Food Prot*, 2014, 77: 738–744
- 69 Williams P E, Tait C A G, Innes G M, et al. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J Anim Sci*, 1991, 69: 3016–3026
- 70 Yang W Z, Beauchemin K A, Vedres D D, et al. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Anim Feed Sci Tech*, 2004, 114: 179–193

- 71 Stein D R, Allen D T, Perry E B, et al. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J Dairy Sci*, 2006, 89: 111–125
- 72 Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10: 259–266
- 73 Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, 2001, 107: 13–19
- 74 Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol*, 1999, 21: 317–338
- 75 Erickson K L, Hubbard N E. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr*, 2000, 130: 403S–409S
- 76 Seo J K, Kim S W, Kim M H, et al. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian Australas J Anim Sci*, 2010, 23: 1657–1667
- 77 Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, et al. *Lactobacilli* and *streptococci* induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 1998, 66: 6058–6062
- 78 Tejada-Simon M V, Ustunol Z, Pestka J J. Effects of lactic acid bacteria ingestion on basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse. *J Food Protect*, 1999, 62: 287–291
- 79 Haller D, Bode C, Hammes W P, et al. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, 2000, 47: 79–87
- 80 Christensen H R, Frøkiaer H, Pestka J J. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*, 2002, 168: 171–178

Effects of lactic acid bacteria on the quality of silage and health of ruminants

WANG TianWei¹, CAO YanHong², Yang Guo³ & ZHONG Jin^{1,4,5,6}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² The Animal Husbandry Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001, China;

³ Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

⁴ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁵ Engineering Laboratory for Grass-based Livestock Husbandry, Chinese Academy of Sciences, Hulun Buir 021000, China;

⁶ Key Laboratory of Advanced Technology of Agricultural Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Silage is an essential part of the rations for ruminants. Preparation and production of high-quality silage is vital to improving the quality and efficiency of animal husbandry. The nutritive value and fermentation quality of silage is dependent on not only the type and quality of the forage crop, but also the ensiling technique and epiphytic microbiota. Lactic acid bacteria (LAB), as an important silage additive and feed probiotics, play an important role in improving the quality of silage forage and regulating the growth performance and health of ruminants. LAB offer various advantages for ruminants as potential probiotics and are able to improve nutrient acquisition, growth performance and immune function stimulation in ruminants. In this paper, we review the current knowledge on the effects of LAB on silage quality and ruminant health. The comprehensive and in-depth understanding of the biological functions of important microorganisms, like LAB, in the silage fermentation process, the mechanisms of action, and the physiological effects on ruminant health is useful for developing highly effective compound silage inoculants, and for providing a scientific basis for improving physiological health of ruminants.

lactic acid bacteria, silage, silage quality, ruminants, growth performance, immune function, intestinal health

doi: 10.1360/SSV-2020-0039