

DOI:10.11686/cyxb2021053

http://cyxb.magtech.com.cn

张欢, 牟怡晓, 张桂杰. 添加枸杞副产物对紫花苜蓿青贮发酵品质及微生物多样性的影响. 草业学报, 2022, 31(4): 136—144.

ZHANG Huan, MU Yi-xiao, ZHANG Gui-jie. Effects of *Lycium barbarum* by-products on fermentation quality and microbial diversity of alfalfa silage. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(4): 136—144.

添加枸杞副产物对紫花苜蓿青贮发酵品质及微生物多样性的影响

张欢, 牟怡晓, 张桂杰*

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 本试验旨在研究宁夏地区枸杞副产物对苜蓿青贮品质及微生物多样性的影响, 为提高苜蓿青贮品质和寻找优质饲料添加剂提供科学依据。紫花苜蓿分别与 0(CK)、40(T₁)、60(T₂)、80(T₃) g·kg⁻¹ 枸杞副产物混合青贮, 发酵 60 d 后测定青贮营养成分、发酵品质及微生物多样性。结果表明: 枸杞副产物处理组相比对照组, 显著降低了酸性洗涤纤维含量 ($P < 0.01$), 显著提高了多糖含量 ($P < 0.01$); 对照组 pH 值及氨态氮/总氮分别为 4.91、8.58%, 苜蓿青贮中 pH、氨态氮及乙酸含量随枸杞副产物比例增加而显著降低 ($P < 0.01$), 乳酸含量及乳酸乙酸比显著增加 ($P < 0.01$); 此外, 枸杞副产物提高了青贮有氧稳定性, 其中 T₁ 及 T₂ 处理组有氧稳定性较高。苜蓿青贮优势菌属主要为乳杆菌属、魏斯氏菌属和片球菌属, 枸杞副产物降低了苜蓿青贮中乳杆菌属的相对丰度, 增加了魏斯氏菌属及片球菌属的相对丰度。综上所述, 枸杞副产物可改善苜蓿青贮发酵品质, 提高有氧稳定性, 改变微生物群落结构, 且枸杞副产物添加量为 60 g·kg⁻¹ 的处理组青贮发酵效果优于其他添加量。

关键词: 苜蓿; 枸杞副产物; 青贮发酵品质; 微生物多样性

Effects of *Lycium barbarum* by-products on fermentation quality and microbial diversity of alfalfa silage

ZHANG Huan, MU Yi-xiao, ZHANG Gui-jie*

School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: In order to develop additives that improve the fermentation quality of alfalfa silage, the fermentation quality and microbial diversity of alfalfa silages prepared with addition of different *Lycium barbarum* by-products (LBP) were studied. Alfalfa silage was prepared without (CK) and with 40 (T₁), 60 (T₂), and 80 (T₃) g·kg⁻¹ LBP. After 60 days of fermentation, the nutrient levels, fermentation quality and microbial diversity of the silages were determined. It was found that the concentrations of acid detergent fiber in the LBP silages significantly ($P < 0.01$) decreased, while polysaccharide significantly ($P < 0.01$) increased as the proportion of LBP increased in the alfalfa silage. The pH value and ammonia nitrogen: total nitrogen ratio of CK silages were 4.91 and 8.58%, respectively. As the proportion of LBP increased in the alfalfa silages, the contents of ammonia nitrogen, acetic acid and pH significantly ($P < 0.01$) decreased, while lactic acid level and the ratio of lactic acid to acetic acid significantly ($P < 0.01$) increased.

收稿日期: 2021-02-03; 改回日期: 2021-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660694), 农牧交错带牛羊牧繁农育关键技术集成示范项目(16200158-08)和宁夏高等学校一流学科建设(草学学科)资助项目(NXYLXK2017A01)资助。

作者简介: 张欢(1996-), 女, 宁夏青铜峡人, 在读硕士。E-mail: 479592543@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: Guijiezhang@126.com

0.01) increased. The silage aerobic stability was improved in LBP treatments, although the addition of LBP at $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ decreased aerobic stability compared with addition of 40 and $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The dominant alfalfa silage bacterial genera were *Lactobacillus*, *Weissella* and *Pediococcus*. The relative abundance of *Lactobacillus* in LBP treatments was lower than in the CK treatment, while the relative abundance of *Weissella* and *Pediococcus* in LBP treatments was higher than in the CK treatment. The results confirm that LBP addition can improve alfalfa silage fermentation quality and aerobic stability, and change microbial community structure. The $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ LBP treatment was more effective than other tested treatments in enhancing silage fermentation.

Key words: alfalfa; *Lycium barbarum* by-products; silage fermentation quality; microbial diversity

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)因营养品质佳而广泛用于畜牧业,由于收获受雨季影响而制约牧草加工利用。青贮是基于厌氧条件下乳酸发酵的贮存方法,可较大程度保留青绿饲料营养成分,并有利于解决季节性饲草短缺的问题^[1-2]。紫花苜蓿可溶性碳水化合物含量低、干物质含量低、缓冲能高且附生乳酸菌数量少,因而青贮发酵品质较差。枸杞(*Lycium barbarum*)是我国西北干旱地区重要药食同源的植物资源,是宁夏传统优势特色产业之一。截至2018年,宁夏全区枸杞种植面积达 6.67 万 hm^2 ,年枸杞干果产量达 $14 \text{ 万 t}^{[3]}$ 。枸杞副产物(*Lycium barbarum* by-products, LBP)为枸杞加工业副产品,主要包括残次果、果柄和枸杞叶等。据估算,宁夏枸杞主产区枸杞干果残次品年产量为 $6 \text{ 万} \sim 7 \text{ 万 t}^{[4]}$,大量LBP不合理利用将带来环境污染及资源浪费等问题。近年来,抗生素滥用造成细菌耐药性和药物残留等问题日益突出。因此,将枸杞等中草药作为饲料添加剂开发是替代抗生素、降低成本的重要举措。

枸杞枝条、叶厌氧发酵后,仍保留其药用及营养成分,可提高反刍动物饲料中蛋白质及有机酸含量并促进畜禽肠道健康^[5-7]。此外,宁夏枸杞及LBP富含活性物质枸杞多糖^[8-9],是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物,已作为安全的非抗生素替代品用作动物饲料^[10]。枸杞多糖具有抗氧化、免疫调节等生物活性,可促进反刍动物瘤胃发酵,并抑制家畜感染病毒^[10-12]。研究表明,枸杞中多糖类物质经发酵后分解为小分子糖类,可增加乳酸菌和双歧杆菌丰度,抑制肠杆菌生长^[13-14]。基于此,推测LBP可作为青贮添加剂,通过改善糖发酵底物和抑制有害微生物来提高青贮质量。本研究针对苜蓿青贮品质不佳及LBP资源利用两个问题,研究适宜比例LBP对苜蓿青贮营养成分、发酵品质和微生物多样性的影响,以期LBP合理开发、高效利用及改善苜蓿青贮发酵品质提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验分为对照组(CK)和LBP处理组,共设4个处理,每个处理4个重复。对照组为苜蓿单贮,处理组为苜蓿枸杞副产物混合青贮,二者混合比例分别为每 kg 青贮饲料(基于鲜重基础) $40(\text{T}_1)$ 、 $60(\text{T}_2)$ 、 $80 \text{ g}(\text{T}_3)$ 枸杞副产物(风干重)。LBP含水量为 6.26% ,按上述比例与苜蓿混合后通过晾晒和添加水分将含水量调至 65% 左右。约 500 g 装入密封发酵罐(瓶口直径 92 mm ,封盖高 97 mm ,密度约为 $775 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$),置于室温贮存 60 d 。青贮 60 d 后测定营养成分、发酵特性及微生物多样性。

1.2 试验材料

紫花苜蓿(中苜三号):种植于宁夏农垦茂盛草业有限公司(温带大陆性气候, $106^{\circ}03' \text{ E}$, $38^{\circ}33' \text{ N}$,海拔 1135 m),2019年5月18日收获后立即运回实验室用闸刀切短至 $1 \sim 2 \text{ cm}$ 备用。

枸杞副产物:购于宁夏绿健源生物科技有限公司,粉状。

1.3 指标测定

1.3.1 发酵参数及化学成分 取 10 g 青贮饲料样品于 90 mL 蒸馏水,匀浆 1 min , 4°C 下浸提 24 h ,经4层纱布和双层滤纸过滤后获得青贮饲料浸提液,每个样品取4份浸提液 -20°C 保存。分别用雷磁PHS-3G精密pH计、

苯酚一次氯酸钠比色法^[15]、乳酸测试盒(A019-2-1型,南京建成生物工程研究所)乳酸脱氢酶法和日本岛津GC-2010气相色谱仪测定pH值、氨态氮、乳酸、乙酸和丁酸含量。

原料及剩余青贮饲料取200 g装入信封于105℃杀青30 min,65℃烘箱烘干48 h至恒重,测定干物质含量,粉碎后过2 mm筛进行化学分析。参照张丽英^[16]的方法测定粗蛋白质、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量;参照李富国^[17]的方法测定可溶性碳水化合物含量;使用总多糖含量测试盒(ZDT-1-Y型,苏州科铭生物)微量法测定多糖含量。

1.3.2 有氧稳定性 发酵60 d后将青贮饲料装入新的发酵袋中,将温度记录仪(HOBO Pendant Temperature,美国)放入发酵袋几何中心处,封口并在青贮袋上扎孔,使空气可以自由进入袋中,置于室温下保存。同时在室内放置温度记录仪,每30 min记一次温度。若青贮袋中温度高于室温2℃,则说明青贮饲料开始腐败变质,计算青贮饲料开袋至腐败变质的时间即为有氧稳定性。

1.3.3 原料及青贮饲料微生物多样性测定 使用FastDNA[®] Spin Kit for Soil(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, 美国)试剂盒提取样品中微生物总DNA。选用细菌16S rRNA的V3~V4可变区,采用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对所提取的DNA模板进行PCR扩增。使用Illumina Miseq测序平台(Illumina Corporation, San Diego, 美国)进行测序,由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4 数据处理

采用IBM SPSS 18.0比较均值进行ANOVA方差分析,组间差异利用Duncan氏进行多重比较, $P<0.05$ 作为差异显著并标注。使用Uparse软件对有效序列进行OTU聚类(相似度97%以上),利用RDP classifier比对Silva数据库(SSU132),对每条序列进行物种分类注释,设置比对阈值为70%。采用Mothur软件平台进行Alpha多样性分析。

2 结果与分析

2.1 青贮原料特性

紫花苜蓿和LBP青贮前营养成分及微生物组成分别见表1及图1。LBP的CP含量高达17.16%,NDF和ADF含量相对较低。LBP和紫花苜蓿主要生物活性成分多糖含量(基于鲜重)分别为1.70%和1.30%。紫花苜蓿附生微生物中,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)及片球菌属(*Pediococcus*)相对丰度分别为2.65%、1.10%及0.06%;LBP中魏斯氏菌属相对丰度为0.23%,并含有0.12%片球菌属。紫花苜蓿中泛菌属(*Pantoea*)相对丰度为13.21%,而LBP中泛菌属相对丰度较低,为12.11%。

表1 青贮原料化学成分

Table 1 Nutrient composition of fresh alfalfa and LBP

项目 Item	紫花苜蓿 Alfalfa	枸杞副产物 LBP
干物质 Dry matter (DM, %FW)	35.74	93.74
粗蛋白质 Crude protein (CP, %DM)	21.62	17.16
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %DM)	24.86	15.97
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %DM)	40.73	22.05
可溶性碳水化合物 Water-soluble carbohydrates (WSC, %DM)	2.13	6.67
多糖 Polysaccharide (%DM)	1.30	1.70

2.2 枸杞副产物和苜蓿青贮饲料营养成分分析

LBP可提高苜蓿青贮饲料多糖含量(表2),且随LBP比例上升而显著增加($P<0.05$);NDF含量随LBP添加量的增加而显著下降($P<0.05$); T_3 处理中WSC含量显著高于其他处理($P<0.05$),但 T_1 、 T_2 和CK之间无显著差异($P>0.05$)。

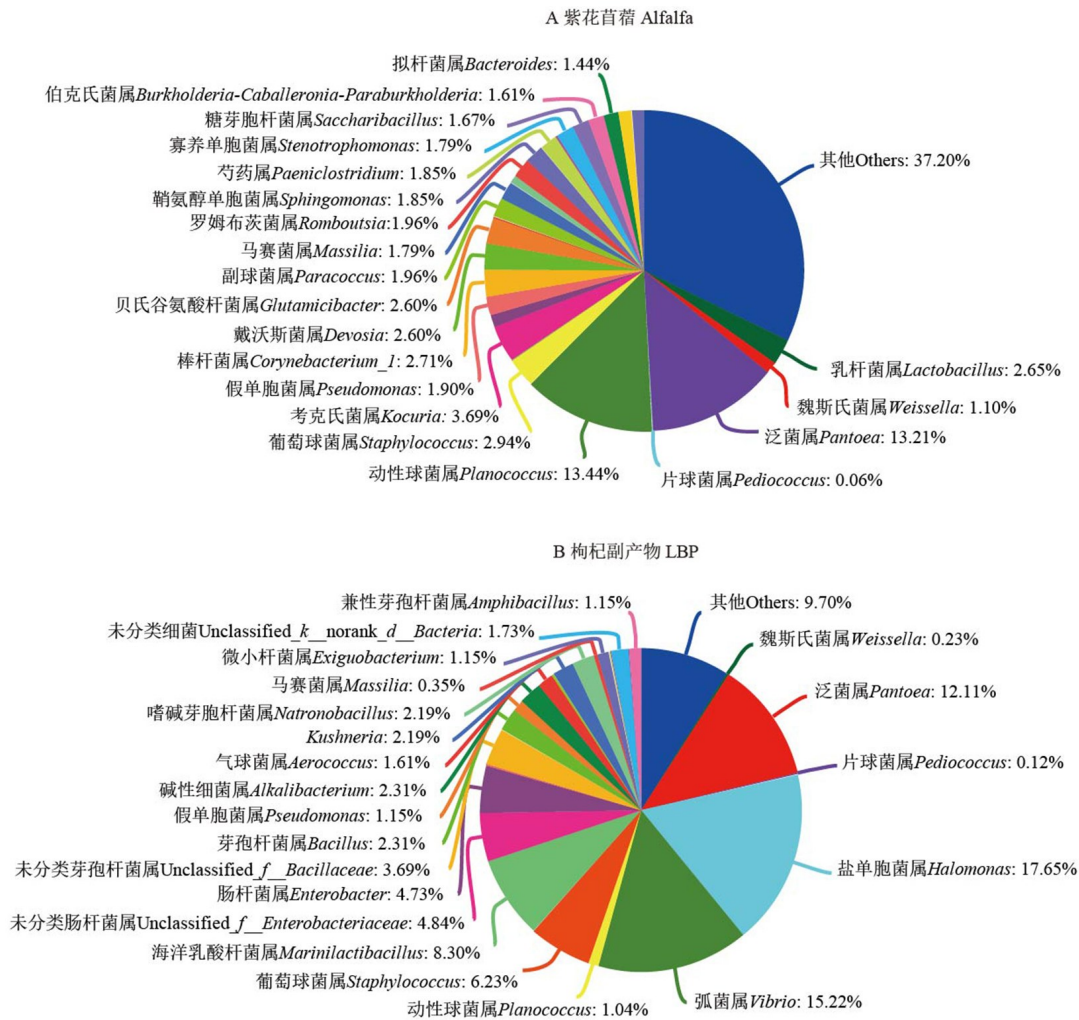


图 1 青贮前紫花苜蓿和枸杞副产物微生物组成
Fig. 1 Microbial composition of fresh alfalfa and LBP

表 2 枸杞副产物对紫花苜蓿青贮饲料营养成分的影响
Table 2 Effects on nutrient composition of alfalfa silage prepared with LBP

测定项目 Item	CK	T ₁	T ₂	T ₃	SEM	P 值 P value
干物质 Dry matter (%FW)	33.03a	33.47a	33.19a	32.28a	0.21	0.22
粗蛋白质 Crude protein (%DM)	21.35a	21.33a	21.85a	22.91a	0.32	0.26
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (%DM)	27.33b	29.48a	27.02b	25.58b	0.41	<0.01
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (%DM)	39.46a	37.44b	36.82b	35.42c	0.47	<0.01
可溶性碳水化合物 Water-soluble carbohydrates (%DM)	0.47b	0.46b	0.44b	0.58a	0.01	<0.01
多糖 Polysaccharide (%DM)	0.46b	0.71a	0.73a	0.76a	0.42	<0.01

注：同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，下同。
Note: Different lowercase letters in the same row mean significant differences at $P<0.05$, the same below.

2.3 枸杞副产物和苜蓿青贮发酵品质分析

LBP处理组的pH值和氨态氮含量显著降低($P<0.05$),并显著增加乳酸含量及乳酸乙酸比($P<0.05$),所有青贮样品中均未检测到丁酸(表3)。苜蓿自然发酵开封后,仅95 h后有氧变质(图2)。LBP处理组较对照组有氧稳定时间分别延长至214、213、170 h,表明LBP可提高苜蓿青贮饲料有氧稳定性。LBP添加比例超过6%时有氧稳定性略有降低,但仍高于对照组。

表3 枸杞副产物对紫花苜蓿青贮饲料发酵品质的影响

Table 3 Effects on fermentation quality of alfalfa silage prepared with LBP

项目 Item	CK	T ₁	T ₂	T ₃	SEM	P 值 P value
pH	4.91a	4.45b	4.39b	4.31b	0.07	<0.01
氨态氮/总氮 Ammonia nitrogen/total nitrogen (%)	8.58a	7.53b	7.24b	5.74c	0.32	<0.01
乳酸 Lactic Acid (LA, g·kg ⁻¹ FW)	3.71d	4.55c	5.83b	6.86a	0.37	<0.01
乙酸 Acetic acid (AA, g·kg ⁻¹ FW)	7.33a	6.47a	6.36a	3.31b	0.54	<0.05
乳酸/乙酸 LA/AA	0.51c	0.73bc	0.94b	2.07a	0.18	<0.01

2.4 枸杞副产物和苜蓿青贮饲料微生物多样性指数特征分析

Alpha多样性分析中,所有样本 Coverage 指数均在 0.99 以上(表 4),表明测序结果足以反映样本中绝大部分微生物物种信息。样本中序列丰度>1%的 OTU 数目分别为 57(CK)、59(T₁)、72(T₂)、94(T₃), OTU 数目随 LBP 添加比例增加而上升,说明 LBP 可增加苜蓿青贮中微生物丰富度,促进菌群增殖。T₃处理组 Chao 指数显著($P<0.05$)高于对照组,说明添加一定量 LBP 可增加苜蓿青贮中微生物丰度。而各处理香农指数无显著差异,表明 LBP 对苜蓿青贮中微生物多样性无显著($P>0.05$)影响。

表4 Alpha多样性指数

Table 4 Alpha diversity index

项目 Item	CK	T ₁	T ₂	T ₃	SEM	P 值 P value
OTU	57c	59c	72b	94a	3.30	<0.01
香农指数 Shannon index	1.73	1.65	1.76	1.69	0.02	0.09
Chao 指数 Chao index	97.06b	96.67b	109.59b	156.98a	6.75	<0.01
Coverage 指数 Coverage index	0.9994a	0.9993ab	0.9992b	0.9989c	0.00	<0.01

2.5 枸杞副产物和苜蓿青贮饲料微生物群落的 Venn 图分析

4 个不同处理共获得 285 个 OTU(图 3),其中共有 OTU 数目为 67 个,占比为 23.51%。CK、T₁、T₂和 T₃分别含有 137、138、176 和 208 个 OTU,表明随 LBP 添加比例增加,OTU 数目随之上升。CK、T₁、T₂和 T₃中所特有的 OTU 数目分别为 15、14、24 和 41 个。T₁和 T₂两个处理的 213 个 OTU 中,共有 101 个 OTU,占比为 47.42%;T₁和 T₃两个处理的 241 个 OTU 中,共有 105 个 OTU,占比为 43.57%;T₂和 T₃两个处理的 251 个 OTU 中,共有 133 个 OTU,占比为 52.99%,说明 T₂和 T₃微生物组成更为接近。T₁和 CK 两个处理

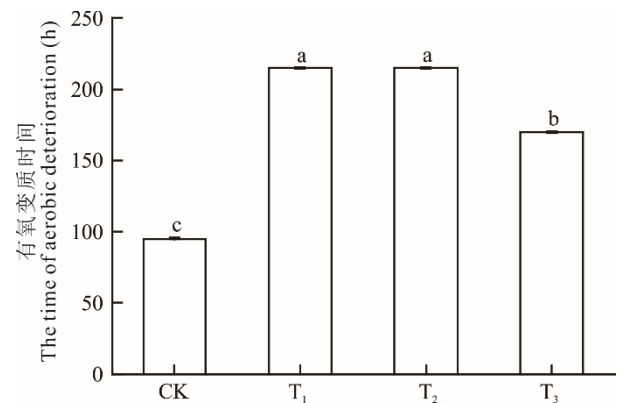


图2 枸杞副产物对紫花苜蓿青贮饲料有氧稳定性的影响

Fig. 2 Effects on aerobic stability of alfalfa silage prepared with LBP

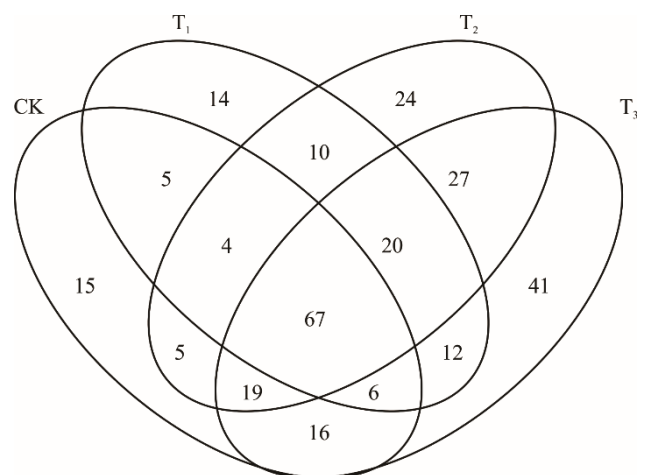


图3 基于 OTU 水平的青贮细菌群落的 Venn 图

Fig. 3 Venn map of silage bacteria community on OTU level

的 193 个 OTU 中,共有 82 个 OTU,占比为 42.49%; T_2 和 CK 两个处理的 218 个 OTU 中,共有 95 个 OTU,占比为 43.58%; T_3 和 CK 两个处理的 237 个 OTU 中,共有 108 个 OTU,占比为 45.57%,表明 T_3 和 CK 微生物组成更为接近。

2.6 基于属水平的枸杞副产物和苜蓿青贮饲料微生物丰度分析

LBP 和苜蓿青贮在属水平下丰度前 10 的微生物组成比较见图 4。苜蓿青贮优势菌属分别为乳杆菌属、魏斯氏菌属和片球菌属。LBP 降低了苜蓿青贮中乳杆菌属相对丰度,增加了魏斯氏菌属和片球菌属($P<0.05$)相对丰度。对照组乳杆菌属相对丰度为 70.60%,添加 LBP 后分别下降至 66.40%(T_1)、64.92%(T_2)和 56.77%(T_3);对照组魏斯氏菌属相对丰度为 23.73%,添加 LBP 后分别增加至 27.92%(T_1)、26.03%(T_2)和 32.24%(T_3);对照组片球菌属相对丰度为 2.82%,添加 LBP 后分别增加至 3.19%(T_1)、6.19%(T_2)和 7.20%(T_3)。肠球菌属(*Enterococcus*)、气球菌属(*Aerococcus*)和泛菌属(*Pantoea*)极显著($P<0.01$)影响不同处理中微生物群落的相对丰度。

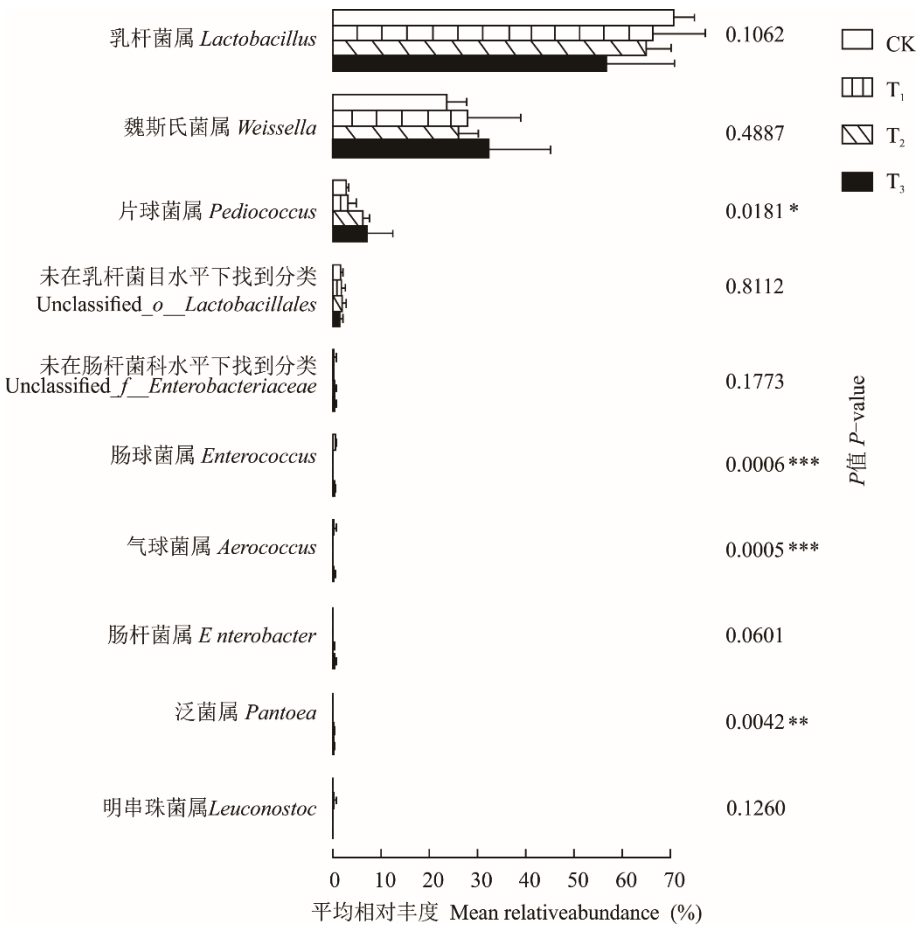


图 4 青贮微生物相对丰度(前 10 个属)变化
Fig. 4 Microbial abundance of silage based on percentages on genus level (top 10 genus)
*: $0.01<P\leq 0.05$; **: $0.001<P\leq 0.01$; ***: $P\leq 0.001$.

3 讨论

3.1 枸杞副产物对苜蓿青贮饲料营养成分的影响

原料特性会直接影响青贮饲料品质^[18]。LBP 的 CP、NDF 和 ADF 含量分别为 17.16%、22.05% 和 15.97%。相对较高的 CP 含量和较低的纤维含量表明 LBP 既可作为潜在优质动物蛋白饲料来源,又具有较好的消化性能。WSC 含量是决定青贮饲料发酵品质的重要因素之一^[19]。本研究发现 T_3 处理组可提高青贮饲料中 WSC 含量,但

添加比例低于 $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 则对苜蓿青贮饲料无影响。本试验中, LBP 处理组中多糖含量显著高于对照组, 但不同添加比例之间无显著差异, 这是由于枸杞多糖类物质经发酵后被消耗或降解为更易吸收的小分子糖类^[20-21], LBP 中多糖转化为糖类物质可为乳酸菌提供更多发酵基质。青贮中多糖含量较发酵之前有所下降, 这可能与青贮过程中某些微生物利用多糖作为糖源有关。马晓娟等^[21]研究表明, 枸杞多糖可作为益生元对乳酸菌起到增殖作用, 进一步表明乳酸菌代谢与转化可能会与多糖有关。综上所述, 通过对青贮原料和青贮饲料营养成分的分析表明, LBP 有助于提高紫花苜蓿青贮饲料营养价值和活性成分。

3.2 枸杞副产物对苜蓿青贮品质的影响

青贮是一种基于乳酸发酵的牧草贮存方法, 在厌氧条件下利用乳酸菌分解糖类产生大量乳酸, 由于乳酸和其他有机酸的产生, 致使 pH 值下降, 并抑制腐败菌和病原微生物生长^[22]。与对照组相比, 随着 LBP 比例增加 pH 值呈下降趋势, 表明 LBP 可促进苜蓿青贮快速降低 pH 值。乙酸是异型发酵产物, 有利于提高青贮有氧稳定性, 乳酸乙酸比能反映同型发酵程度, 值越高同型发酵程度越高^[23]。LBP 添加量为 $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时降低了乙酸含量, 不利于青贮的有氧稳定性。与对照相比, LBP 处理可增加苜蓿青贮饲料的有氧稳定性(图 2), 可能与枸杞多糖等活性物质抑制不良微生物有关, 其中 40 和 $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加量效果较佳。本试验中乳酸含量随 LBP 比例的增加而增加, 乳酸乙酸比增大。这可能是因为枸杞经发酵后主要含有乳酸、酒石酸和草酸等有机酸^[20], 从而提高了乳酸含量。氨态氮反映了青贮中蛋白质等含氮物质的降解程度, 氨态氮的积累受植物蛋白酶活性和微生物活性影响, 当 pH 值达到 5.0~6.0 时, 梭状芽孢杆菌和植物蛋白水解酶活性较大, 从而积累大量氨态氮^[24]。对照组氨态氮含量较高的原因可能是 pH 值(4.91)较高, LBP 可降低苜蓿青贮饲料中氨态氮含量, 可能是由于 pH 值较低所致。此外, 枸杞副产物中某些生物活性成分可能通过抑制不良微生物来减少蛋白质水解。

3.3 枸杞副产物对苜蓿青贮微生物多样性的影响

青贮原料在发酵和贮藏过程中会产生一系列生化和微生物菌群变化^[25]。紫花苜蓿鲜草中泛菌属(*Pantoea*)微生物的相对丰度为 13.21%, 泛菌属微生物在厌氧条件下将糖发酵为乙酸、丙酸和琥珀酸^[26], 这也解释了苜蓿青贮乙酸含量高、乳酸乙酸比低的现象。本试验中, 发酵完成后的青贮饲料相比青贮原料的微生物多样性降低。大量学者研究表明苜蓿青贮过程中和发酵完成后微生物群落组成及相对丰度将发生变化, 进而影响青贮饲料质量^[22, 27]。本试验结果表明, 苜蓿青贮 OTU 数、Chao 指数随 LBP 比例增加而增加, 这意味着 LBP 可改变苜蓿青贮某些微生物丰富度。由于受 LBP 添加比例或附生微生物的影响, 其对苜蓿青贮多样性影响较小, 或因青贮中某些附生微生物对厌氧和酸性条件适应性较差, 构成苜蓿青贮发酵的稳定微生物群落较为单一。通过 Venn 图分析也得出不同处理间微生物组成较为单一的结论。研究表明苜蓿青贮微生物主要由厚壁菌门中乳杆菌属、片球菌属和魏斯氏菌属等组成^[22], 本试验也得出相似结论。产酸能力强的乳酸球菌(如肠球菌、乳球菌和类肠膜明串珠菌)通常为青贮发酵启动菌, 乳杆菌则为青贮稳定期主要菌群^[28]。本研究发现青贮发酵 60 d 后, 乳杆菌属、魏斯氏菌属和片球菌属为苜蓿青贮发酵的优势菌属。张玲^[29]研究认为残次枣粉改变了苜蓿青贮微生物群落结构, 提高了优势菌种乳杆菌属、魏斯氏菌属的相对丰富度, 使青贮微生物多样性趋于单一化。从青贮微生物相对丰度变化来看, LBP 处理降低了苜蓿青贮中乳杆菌属微生物的相对丰度, 增加了魏斯氏菌属和片球菌属微生物的相对丰度, 表明 LBP 通过改变苜蓿青贮的微生物相对丰度, 从而进一步影响微生物的群落组成。片球菌属的相对丰度较高时会产生更多乳酸^[30], 进一步证实 LBP 可增加苜蓿青贮中乳酸含量, 改善苜蓿青贮发酵品质。

4 结论

本研究表明, 苜蓿青贮添加 LBP 后, pH 值和氨态氮含量降低, 多糖、乳酸含量及乳酸乙酸比提高。紫花苜蓿自然发酵主要菌群为乳杆菌属、魏斯氏菌属和片球菌属, LBP 降低了苜蓿青贮中乳杆菌属相对丰度, 增加了魏斯氏菌属和片球菌属相对丰度。苜蓿与 LBP 混合青贮有利于提高青贮发酵品质及有氧稳定性, 并改变了微生物群落结构, 综合来看以 $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加量改善效果最佳。

参考文献 References:

- [1] Wüstholtz J, Carrasco S, Berger U, *et al.* Fattening and slaughtering performance of growing pigs consuming high levels of alfalfa silage (*Medicago sativa*) in organic pig production. *Livestock Science*, 2017, 200: 46—52.
- [2] Li D, Ni K, Zhang Y, *et al.* Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(12): 2768—2782.
- [3] Ningxia Provincial Bureau of Statistics, NBS survey office in Ningxia. *Ningxia statistical year-book (2019)*. Beijing: China Statistics Press, 2019.
宁夏回族自治区统计局, 国家统计局宁夏调查总队. *宁夏统计年鉴(2019)*. 北京: 中国统计出版社, 2019.
- [4] Chen L, Zhang L Q, Yin Q N, *et al.* Current status and countermeasures of resources and feed utilization in Ningxia wolfberry. *Feed Research*, 2015(22): 61—63.
陈亮, 张凌青, 尹庆宁, 等. 宁夏枸杞资源及饲料化利用现状及对策. *饲料研究*, 2015(22): 61—63.
- [5] Yang Q F, Chen K Q, Gou Q, *et al.* Silage of abandoned-growing branches of *Lycium barbarum*. *Pratacultural Science*, 2020, 37(5): 1002—1009.
杨其芳, 陈开琼, 苟琪, 等. 宁夏枸杞徒长枝青贮研究. *草业科学*, 2020, 37(5): 1002—1009.
- [6] Liang X J, An W, Liu Z Q. Study on the effect of eucalyptus chinensis as feed constituents in feeding dairy cows. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary*, 2008, 38(3): 11—13.
梁小军, 安魏, 刘竹青. 枸杞树平茬枝条作为饲料组成成分饲喂奶牛效果研究. *甘肃畜牧兽医*, 2008, 38(3): 11—13.
- [7] Yang J P, Guo J L, Nie F R, *et al.* Study on the change of bioactive components and nutrients of *Lycium barbarum* leaf before and after fermentation. *China Feed*, 2018(12): 36—40.
杨建平, 郭建来, 聂芙蓉, 等. 枸杞叶发酵物生物活性成分及营养成分的变化研究. *中国饲料*, 2018(12): 36—40.
- [8] Zhang C J. *Comprehensive utilization of Ningxia wolfberry*. Wuhan: Hubei University of Technology, 2015.
张崇坚. *宁夏枸杞的综合开发利用研究*. 武汉: 湖北工业大学, 2015.
- [9] Long X Y, Ye L, Cai L J, *et al.* Extraction of polysaccharide in *Lycium barbarum* residue. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(9): 248—251.
龙晓燕, 叶林, 蔡林军, 等. 枸杞子残渣中多糖的提取工艺研究. *食品工业科技*, 2017, 38(9): 248—251.
- [10] Li Z, Bai H, Zheng L, *et al.* Bioactive polysaccharides and oligosaccharides as possible feed additives to manipulate rumen fermentation in Rusitec fermenters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 109: 1088—1094.
- [11] Xie J H, Tang W, Jin M L, *et al.* Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60: 148—160.
- [12] Wang J, Hu Y, Wang D, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46(2): 212—216.
- [13] Zhang C Y, Gan L P, Du M Y, *et al.* Effects of dietary supplementation of alfalfa polysaccharides on growth performance, small intestinal enzyme activities, morphology, and large intestinal selected microbiota of piglets. *Livestock Science*, 2019, 223: 47—52.
- [14] Ding Y, Yan Y, Chen D, *et al.* Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice. *Food and Function*, 2019, 10(6): 3671—3683.
- [15] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 1980, 63(1): 64—75.
- [16] Zhang L Y. *Feed analysis and feed quality testing technology*. Beijing: China Agricultural University, 2007: 48—171.
张丽英. *饲料分析及饲料质量检测技术*. 北京: 中国农业大学, 2007: 48—171.
- [17] Li F G. *Studies of rice straw silage and its feeding value on beef cattle*. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.
李富国. *青贮水稻秸发酵品质及其饲喂肉牛效果的研究*. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [18] Yan Y, Li X, Guan H, *et al.* Microbial community and fermentation characteristic of Italian ryegrass silage prepared with corn stover and lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 166—173.
- [19] He L, Lv H, Xing Y, *et al.* The nutrients in *Moringa oleifera* leaf contribute to the improvement of stylo and alfalfa silage: Fermentation, nutrition and bacterial community. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122733>, 2020-01-03.
- [20] Zhang R X, Cui X Y, Ma Y, *et al.* Effects of *Lycium chinense* mill fermentation liquid on antioxidant activity and immunoregulation. *Food Research and Development*, 2019, 40(10): 55—60.
张瑞雪, 崔欣悦, 马勇, 等. 枸杞发酵液抗氧化和免疫调节作用研究. *食品研究与开发*, 2019, 40(10): 55—60.

- [21] Ma X J, Xie Y F, Yu Y F, *et al.* Changes of polysaccharide and viable bacteria in fermented *Lycium barbarum* pulp. China Food Safety Magazine, 2019(28): 62—65.
马晓娟, 谢有发, 余银芳, 等. 发酵枸杞原浆中多糖、活菌数的变化规律. 食品安全导刊, 2019(28): 62—65.
- [22] Ogunade I M, Jiang Y, Pech Cervantes A A, *et al.* Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. Journal of Dairy Science, 2018, 101(3): 2048—2059.
- [23] Zhang H, Lei X Q, Zhu H F, *et al.* Study on mix ratio of alfalfa and sorghum-sudangrass hybrid silage in the Ningxia yellow river irrigation region. Chinese Journal of Grassland, 2020, 42(5): 136—142.
张欢, 雷晓青, 朱鸿福, 等. 宁夏黄灌区紫花苜蓿与高丹草适宜混贮比例研究. 中国草地学报, 2020, 42(5): 136—142.
- [24] Wang Y, Chen X, Wang C, *et al.* The bacterial community and fermentation quality of mulberry (*Morus alba*) leaf silage with or without *Lactobacillus casei* and sucrose. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122059>, 2019-08-26.
- [25] Zhang S, Chang J, Hu Z F, *et al.* Harmful microorganisms in silage and their suppression measures. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(12): 4308—4314.
张适, 常杰, 胡宗福, 等. 青贮饲料有害微生物及其抑制措施. 动物营养学报, 2017, 29(12): 4308—4314.
- [26] Jaxsens L, Devlieghere F, Ragaert P, *et al.* Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. International Journal of Food Microbiology, 2003, 83(3): 263—280.
- [27] Wang C, He L, Xing Y, *et al.* Fermentation quality and microbial community of alfalfa and stylo silage mixed with *Moringa oleifera* leaves. Bioresource Technology, 2019, 284: 240—247.
- [28] Tao Y, Li F, Gao F Q, *et al.* Fermentation quality and microbial characteristics of *Amaranthus hypochondriacus* corn mixed silage. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(12): 119—129.
陶雅, 李峰, 高凤芹, 等. 籽粒苋与青贮玉米混贮品质及微生物特性研究. 草业学报, 2016, 25(12): 119—129.
- [29] Zhang L. Study on the quality and aerobic stability of inferior jujube powder and alfalfa silage. Shihezi: Shihezi University, 2019.
张玲. 残次枣粉与苜蓿混贮品质及其有氧稳定性研究. 石河子: 石河子大学, 2019.
- [30] Dong Z, Shao T, Li J, *et al.* Effect of alfalfa microbiota on fermentation quality and bacterial community succession in fresh or sterile Napier grass silages. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 4288—4301.