

DOI:10.11686/cyxb2022087

http://cyxb.magtech.com.cn

李海萍, 关皓, 贾志锋, 等. 抗冻融乳酸菌的筛选及其对燕麦青贮品质和有氧稳定性的影响. 草业学报, 2022, 31(12): 158—170.

LI Hai-ping, GUAN Hao, JIA Zhi-feng, *et al.* Screening of antifreeze-thawed lactic acid bacteria and their effects on oat silage fermentation quality and aerobic stability. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(12): 158—170.

抗冻融乳酸菌的筛选及其对燕麦青贮品质和有氧稳定性的影响

李海萍^{1,3}, 关皓², 贾志锋¹, 刘文辉¹, 马祥¹, 刘勇¹, 汪辉², 马力⁴, 周青平^{2*}

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016; 2. 西南民族大学四川若尔盖高寒湿地生态系统国家野外科学观测研究站, 四川 成都 610041; 3. 青海师范大学数学与统计学院, 青海 西宁 810016; 4. 青海省草原总站, 青海 西宁 810016)

摘要:为提高冻融条件下燕麦青贮的发酵品质和有氧稳定性,利用传统的平板培养法,从青藏高原地区分离到437株乳酸菌,从中筛选出4株在反复冻融条件下(20℃/−5℃)能快速生长、高效产酸的抗冻融乳酸菌。经生理、生化特性检测和16S rRNA基因序列比对鉴定,4株菌分别是植物乳杆菌157(LP157)、植物乳杆菌160(LP160)、短乳杆菌248(LB248)和戊糖乳杆菌260(LPE260)。为进一步评价其在冻融条件下对燕麦青贮发酵品质、营养成分、微生物数量及有氧稳定性的影响,试验设7个处理,分别为:1)LP157; 2)LP160; 3)LB248; 4)LPE260; 5)LP160+鼠李糖乳杆菌753混合(MIX); 6)商业菌(COM); 7)等量灭菌蒸馏水(CK),在20℃恒温 and 20℃/−5℃每12 h交替条件(冻融)下分别青贮60 d。结果表明,无论在20℃恒温条件还是在冻融条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组青贮后的pH和干物质损失显著低于CK($P<0.05$),乳酸、乙酸含量均显著高于CK($P<0.05$),肠杆菌、酵母菌和霉菌等不良微生物的生长得到抑制,提高了燕麦青贮品质。有氧暴露5 d后,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组pH和NH₃-N显著($P<0.05$)低于CK、MIX和COM处理组,提高了燕麦青贮的有氧稳定性,尤其LP160作用最显著(70 h VS. 对照11 h)。结果表明,筛选出的4株乳酸菌均具有作为青藏高原地区冻融环境下青贮调制用乳酸菌添加剂的潜质。

关键词:乳酸菌;冻融;发酵品质;有氧稳定性;燕麦青贮

Screening of antifreeze-thawed lactic acid bacteria and their effects on oat silage fermentation quality and aerobic stability

LI Hai-ping^{1,3}, GUAN Hao², JIA Zhi-feng¹, LIU Wen-hui¹, MA Xiang¹, LIU Yong¹, WANG Hui², MA Li⁴, ZHOU Qing-ping^{2*}

1. Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Sichuan Zoige Alpine Wetland Ecosystem National Observation and Research Station, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 3. School of Mathematics and Statistics, Qinghai Normal University, Xining 810016, China; 4. Qinghai Grassland Station, Xining 810016, China

Abstract: The effects of freeze-thaw conditions on the fermentation quality and aerobic stability of oat silage were investigated. Four strains of freeze-thaw-resistant lactic acid bacteria (LAB) with rapid growth and efficient acid

收稿日期:2022-02-22;改回日期:2022-04-14

基金项目:高寒区饲草高效种植与精细加工技术集成与示范(2021-QY-208),高品质燕麦生产及牦牛高效转化利用关键技术研究(2022-NK-130)和国家现代牧草产业技术体系(CARS-34)资助。

作者简介:李海萍(1989—),女,青海西宁人,讲师,在读博士。E-mail: 2015263@edu.qhnu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: qpingzh@aliyun.com

production were screened from 437 strains, which had been isolated from the Qinghai—Tibetan Plateau. Based on physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence alignment, the four strains were identified as *Lactobacillus plantarum* 157 (LP157), *L. plantarum* 160 (LP160), *Lactobacillus brevis* 248 (LB248), and *Lactobacillus pentosus* 260 (LPE260). In order to investigate their effects on the fermentation quality, nutrient composition, microbial counts and aerobic stability of oat silage under freeze-thaw conditions, seven treatments were tested as follows: 1) LP157; 2) LP160; 3) LB248; 4) LPE260; 5) LP160+*Lactobacillus rhamnosus* 753 mixture (MIX); 6) A commercial bacterial silage additive (COM); 7) The same amount of sterilized distilled water (CK). All treatments were ensiled for 60 days at a constant temperature of 20 °C and under a 20 °C/−5 °C regime alternating every 12 h (freeze-thaw). LP inoculation improved silage quality: The pH and dry matter loss in silages inoculated with LP157, LP160, LB248 and LPE260 were significantly lower than CK ($P<0.05$) and lactic acid and acetic acid contents were significantly higher than CK ($P<0.05$), and the growth of spoilage micro-organisms such as coliform bacteria, yeast and mold were inhibited, both with fermentation at constant 20 °C and under freeze-thaw conditions. After aerobic exposure for 5 days, the pH and $\text{NH}_3\text{-N}$ of silages treated with LP157, LP160, LB248 and LPE260 were significantly ($P<0.05$) lower than CK, MIX and COM. The aerobic stability of oat silage was improved, especially when inoculated with LP160 (70 h vs. CK 11 h). The results show that the four screened strains can be used as effective LAB inoculants for silage preparation in the freeze-thaw environment of the Qinghai—Tibetan Plateau.

Key words: lactic acid bacteria; freeze—thaw; fermentation quality; aerobic stability; oat silage

青藏高原昼夜温差大,冷季时间长且饲草匮乏严重,饲草供应季节性不均衡是制约畜牧业发展的瓶颈问题。而燕麦(*Avena sativa*)具有粗蛋白含量高、营养成分高、缓冲能值低等特征,且青藏高原是燕麦主产区之一^[1]。《“十四五”全国畜牧兽医行业发展规划》中明确要大力发展燕麦草等优质饲用牧草生产,构建现代牧草产业体系,进一步将优质饲用燕麦生产提高到了新的高度。加工使“种草”到“养畜”形成真正的链条,而且研究发现,燕麦青贮加工后的营养品质要高于青干草^[2]。青贮技术成本低、操作简单、保存时间长^[3]且青贮饲料被认为是动物营养和碳水化合物的重要来源^[4],反刍动物可以从中获取多不饱和脂肪酸和维生素等,因此可以增加肉类产品的营养价值^[5]。

青贮是一个复杂的微生物动态变化过程,乳酸菌通过将可溶性碳水化合物转化成乳酸和乙酸,从而降低pH,抑制腐败微生物,以此来稳定青贮发酵品质^[6],实现长时间保存,所以青贮能否成功在很大程度上取决于植物附生的乳酸菌能否在密闭的环境中快速繁殖发酵^[7]。且乳酸菌的生长受温度影响较大,青贮在不同温度下的发酵品质和营养品质不同,优势乳酸菌群也不同^[8–10]。牧草上附生的乳酸菌数量较少,实践中通常需要添加乳酸菌来改善青贮发酵品质^[11–12]。燕麦因品种不同附生的乳酸菌数量存在差异^[13],加之青藏高原特殊的气候环境,高质量的青贮加工亟须适宜的优质乳酸菌菌剂。而在青藏高原地区的青贮研究往往集中在恒低温发酵对青贮的影响,也因地制宜地筛选出了一些优质耐低温乳酸菌^[14–17],但关于抗冻融乳酸菌的筛选和应用的研究鲜有报道。Dong等^[18]通过研究牧草冻融后再青贮,发现原料冻融促进了青贮微生物区系中乳酸菌的生长,但是随着时间的延长需氧菌会滋生,表明冻融环境更易造成青贮发酵的不稳定性。

因此,本研究拟在青藏高原地区自然发酵青贮中筛选抗冻融乳酸菌,评价其在冻融条件下对燕麦青贮发酵品质及有氧稳定性的影响,为青藏高原地区高品质青贮生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 乳酸菌的筛选

从青海省海南、海北、海东等地采取的57份自然发酵青贮样品和1份酸奶样品(表1)中共分离出437株乳酸

菌, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,在 deMan-Rogosa-Sharpe (MRS)培养基中活化后,根据青海地区9月收获燕麦时的气象数据,设置1) $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 持续24 h;2)先 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 h后 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 h($-5\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ }^{\circ}\text{C}$);3)先 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 h后 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 h($20\text{ }^{\circ}\text{C}/-5\text{ }^{\circ}\text{C}$)这3种温度模式,培养24 h后检测其pH值和OD值,每个处理3次重复,从中筛选出生长速率最快、产酸效率最高的15株作为候选菌株,在进行生理生化检测和糖发酵试验(陆桥科技有限公司,中国北京)后再以活菌数为 $10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右接种至新鲜燕麦绿汁液中,放置于上述3种温度模式下培养,进行复筛。

1.2 乳酸菌的鉴定

使用细菌DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京)对筛选出的4株菌进行16S rRNA序列的提取,以27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')为PCR引物进行PCR扩增^[19],扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果上传到NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行同源序列比对。从Genbank选取序列相近的标准菌,以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)NCDO1769为外围菌,采用MEGA 7.1软件运用邻接法构建系统发育树。

1.3 青贮调制方法

试验材料为西南民族大学青藏高原研究院红原试验基地2021年种植的燕麦,品种为“领袖”,于乳熟期刈割,留茬高度10 cm。刈割后的燕麦用揉丝机切短揉丝,经短暂晾晒后充分混匀。试验采用双因素完全随机设计,温度分别是 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每12 h交替1次),接菌处理分别是等量无菌蒸馏水(CK)、植物乳杆菌157(*Lactobacillus plantarum* 157, LP157)、植物乳杆菌160(*L. plantarum* 160, LP160)、短乳杆菌248(*Lactobacillus brevis* 248, LB248)、戊糖乳杆菌260(*Lactobacillus pentosus* 260, LPE260)、植物乳杆菌160+鼠李糖乳杆菌753(mixture, MIX混合菌,鼠李糖乳杆菌753由课题组前期筛选)和商业菌(commercial, COM, 购买自台湾亚芯生物科技有限公司,活性菌为植物乳杆菌)。各乳酸菌供试液用无菌蒸馏水稀释至活菌数为 $10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别装入喷壶,以每100 g原料喷洒3 mL菌液为标准,充分混匀后,取700 g装入聚乙烯塑料袋中压实后抽真空,每个处理3个重复(每个处理同时再做3袋,用于有氧暴露试验),分别放置在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,于青贮60 d开袋,所有样品进行微生物计数、化学成分、发酵品质和有氧稳定性分析。

1.4 青贮发酵品质和营养成分分析

开袋后取适量样品于烘箱(电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9053A,上海维菱)中 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,测定干物质(dry matter, DM)含量。研磨后过1 mm筛用于化学成分分析。采用凯氏定氮法测定粗蛋白(crude protein, CP)含量^[20];采用重量法测定灰分含量^[21];采用植物水溶性碳水化合物(water soluble carbohydrates, WSC)含量试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司,中国苏州)测定水溶性碳水化合物含量;采用Van Soest等^[22]的方法测定中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)含量。取20 g样品于180 mL无菌蒸馏水中浸提24 h后过滤,一部分用pH计(雷磁pHS-3C,上海仪电分析仪器有限公司,中国上海)测量pH,剩余的浸提液分别用于氨态氮和有机酸的测定。采用苯酚一次氯酸钠比色法测定氨态氮含量^[23]。浸提液通过0.22 μm 滤头过滤到进样瓶中,用超高效液相色谱仪(赛默飞 UltiMate3000, 美国)测定乳酸、乙酸、丙酸和丁酸含量,色谱条件为:RSpak KC-811色谱柱,流动相0.1% H_3PO_4 ,流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 微生物计数

青贮微生物计数采用平板计数法^[24]。取20 g样品浸没于180 mL灭菌生理盐水(0.85%)中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡1 h,用灭菌蒸馏水依次稀释到 10^{-5} ,从中取原液、 10^{-3} 、 10^{-5} 三个梯度各0.1 mL进行涂布。分别用MRS培养基 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养48 h对乳酸菌进行计数、用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有氧培养72 h对酵母菌和霉菌进行计数,用结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA)培养基 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有氧培养24 h对肠杆菌进行计数,每个梯度每种培养基3个重复。

1.6 有氧暴露试验

青贮60 d开袋后,均匀取800 g的样品于2 L灭菌烧杯中压实,用两层灭菌棉纱布覆盖,将样品在室温条件下放置5 d。通过实时温度记录仪(MT-X,神华科技有限公司,中国深圳)每5 min测量一次青贮核心区域(深度为

10 cm)的温度,持续5 d。取有氧暴露5 d后的样品,进行微生物计数和发酵品质分析。有氧稳定性的计算基于暴露于空气中的青贮饲料的温度超过基准环境温度2℃所持续的时间^[25]。

1.7 数据处理与分析

用Excel对数据进行前期整理,采用SPSS(IBM SPSS statistics 26)软件进行双因素方差分析,分析温度、菌剂及两者交互对青贮所有项目的影响,并用邓肯氏(Duncan's)方法进行处理间多重比较($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 优选乳酸菌的生理生化、糖发酵特性及鉴定

菌株157、160、248和260在5~50℃条件下均能生长,菌株157、160和260可在pH为3且10℃条件下正常生长(表1)。菌株157、160和260可利用的碳源较多,菌株248的糖发酵特性比较特殊(表2)。如图1所示,菌株157和160与植物乳杆菌亲缘关系较近,菌株248与短乳杆菌亲缘关系最近,菌株260与戊糖乳杆菌亲缘关系最近。将筛选得到的3株菌株的16S rRNA序列上传至GenBank,序列号分别为植物乳杆菌160(SUB10183158 *Lactobacillus* MZ749501)、短乳杆菌248(SUB10183450 *Levilactobacillus* MZ768870)和戊糖乳杆菌260(SUB10188144 *Lactiplantibacillus* MZ768872)。将其保存至中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号分别为160(CGMCCNo. 23166)、248(CGMCCNo. 23167)和260(CGMCCNo. 23168)。

2.2 青贮原料的营养成分及微生物数量

在青贮前燕麦的干物质含量为28.96%鲜重(fresh weight, FW),粗蛋白为11.01% DM,水溶性碳水化合物含量为13.30% DM。附生乳酸菌含量为3.70 lg cfu·g⁻¹ FW,肠杆菌、酵母和霉菌含量分别是4.12、2.89、3.14 lg cfu·g⁻¹ FW(表3)。

2.3 抗冻融乳酸菌对燕麦青贮发酵品质的影响

发酵60 d后,无论在20℃条件还是冻融条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组的pH均低于CK组、MIX组和COM组(表4),表明温度对pH影响不显著($P>0.05$),乳酸菌显著影响了青贮pH($P<0.05$)。氨态氮/总氮(NH₃-N/TN)、乳酸、乙酸以及乳酸/乙酸(LA/AA)与温度、乳酸菌以及两者交互作用都极显著相关($P<0.01$)。20℃条件下,除了MIX处理组外其他处理组乳酸含量均显著($P<0.05$)高于CK组,其中LB248处理组的乳酸含量最高;冻融条件下,与CK相比各个菌株处理组的乳酸含量都显著($P<0.05$)升高,且LP157、LP160、LB248和LPE260处理组的含量较CK增加了一倍,较20℃条件下升高幅度大。20℃条件下,LB248处理组的乙酸含量最高,但与LP157和LPE260处理组没有显著($P>0.05$)差异,LP160处理组的乙酸含量显著($P<0.05$)低于LP157、LB248和LPE260处理组;冻融条件下,各乳酸菌菌株处理组的乙酸含量显著($P<0.05$)高于CK组。20℃条件下,除LP248处理组外,其余处理组的LA/AA都显著($P<0.05$)高于CK组,其中LP160处理组最高;冻融条件下,MIX和LP160处理组高于CK,但是差异不显著($P>0.05$),其余均低于CK,在不同的温度处理下出现了不同的LA/AA的变化趋势。在所有的处理中均未检测到丙酸和丁酸。

2.4 抗冻融乳酸菌对燕麦青贮微生物数量的影响

经过青贮加工后,除了LP157和LP160处理组,其余处理组的乳酸菌数量均多于原料。冻融条件下,各乳酸菌处理组的肠杆菌数均低于CK组,且除LP157处理组外其余处理都未检测到肠杆菌。20℃条件下,LPE260、MIX和COM处理组的酵母菌多于原料,而在冻融条件下,CK组和COM处理组的酵母菌增加,其余各乳酸菌处理组的酵母菌数量减少。冻融条件下,各菌株处理组均未检测到霉菌。综合来看,LP160处理组无论在20℃条件还是冻融条件下,都有效抑制了肠杆菌、酵母菌和霉菌的生长(表5)。

2.5 抗冻融乳酸菌对燕麦青贮营养品质的影响

青贮60 d后,除了灰分,其余营养指标均与温度和乳酸菌两个因子极显著相关,而DM、NDF、ADF和WSC与两者交互作用极显著相关($P<0.01$ 表6)。冻融条件下各处理DM含量显著($P<0.05$)高于20℃条件下。20℃条件下,各个乳酸菌处理组的干物质损失(DM loss)显著低于CK组,其中LPE260处理组的DM loss最低,但是各个乳酸菌处理间的差异不显著($P>0.05$);在冻融条件下,除了MIX处理组的DM loss高于CK组外,其余

表 1 乳酸菌生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria strains isolated from silages

项目		菌株 Strain														
Item		9	10	67	74	103	117	157	160	248	260	270	286	365	376	407
采样点 Collection site	海晏 Haiyan	海晏 Haiyan	海晏 Haiyan	湟中 Huangzhong	大通 Datong	平安 Pingan	平安 Pingan	门源 Menyuan	门源 Menyuan	祁连 Qilian	贵南 Guinan	贵南 Guinan	贵南 Guinan	贵南 Guinan	贵南 Guinan	湟源 Huangyuan
来源 Source	玉米 Maize	玉米 Maize	玉米 Maize	玉米 Maize	燕麦 Oat	玉米 Maize	玉米 Maize	燕麦 Oat	燕麦 Oat	酸奶 Yogurt	玉米 Maize	玉米 Maize	玉米 Maize	黑麦 Rye	黑麦 Rye	小黑麦 Triticale
形状 Shape	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod	杆菌 Rod
革兰氏染色 Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 ℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 ℃	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+	++	+	+	+	+
20 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
30 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
50 ℃	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. 0% NaCl, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	+	++	+	w	+	+	w	w	w	w
3. 0% NaCl, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
6. 5% NaCl, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w
6. 5% NaCl, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 3. 0, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
pH 3. 0, 37 ℃	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
pH 3. 5, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
pH 3. 5, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 4. 0, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
pH 4. 0, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 5. 0, 10 ℃	w	+	+	w	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
pH 5. 0, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 6. 0, 10 ℃	+	+	+	w	w	w	+	++	+	w	+	+	+	+	+	+
pH 6. 0, 37 ℃	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

w: 微弱生长 Weak growth (0. 2<OD_{600 nm}<0. 3); +: 正常生长 General growth (0. 3≤OD_{600 nm}<0. 5); ++: 良好生长 Good growth (OD_{600 nm}≥0. 5).

表 2 乳酸菌糖发酵特性

Table 2 Carbohydrate fermentation patens of lactic acid bacteria strains isolated from silages

底物 Substrate	菌株 Strain														
	9	10	67	74	103	117	157	160	248	260	270	286	365	376	407
菊糖 Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+
水杨苷 Salicin (1% NaCl)	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—
M01a 乳糖 M01a actose	—	+	+	—	—	+	w	—	—	+	—	—	w	—	—
M—蔗糖 M—saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	—
山梨醇 Sorbitol	—	—	w	+	—	—	—	—	—	—	—	—	w	w	—
半乳糖 Galactose	—	—	—	—	w	—	—	—	—	—	w	+	—	—	—
果糖 Fructose	+	w	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖醇 Xylitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
七叶苷 Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+
棉子糖 Raffinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L—蔗糖 L—saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+
甘露醇 Mannitol	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+
水杨苷 Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	w	—	—	—	—	—	w	—	+	—	+	+	—	—	—
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蜜二糖 Melibiose	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
马尿酸 Hippuric acid	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
葡萄糖 Glucose (产气 Gas production)	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+

注：“+”，90%及以上菌株可发酵该物质；“—”，90%及以上菌株不可发酵该物质；“w”，可发酵少量该物质。
Note: “+”，90% or more of the strains positive; “—”，90% or more of the strains negative; “w”，weakly positive.

处理均低于CK组,但是差异不显著($P>0.05$)。20℃条件下,LP157、LP160处理组的NDF和ADF都显著低于CK组;冻融条件下,各乳酸菌处理组的NDF(除MIX组外)和ADF与CK组差异均不显著。20℃时,各处理组的CP与CK相比无显著差异,但是LP157、LP160、LB248和LPE260处理组CP含量略高于CK组;冻融条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组CP含量与CK组差异不显著,其中,LB248处理组最高。与原料相比,青贮后CP和WSC含量都有所降低。

2.6 抗冻融乳酸菌对燕麦青贮有氧稳定性的影响

燕麦青贮在有氧暴露5 d后,在20℃条件下,LP157、LP160和LB248处理组的pH显著($P<0.05$)低于CK组,维持在4左右的水平;冻融条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组的pH也显著($P<0.05$)低于CK组,且CK、MIX和COM处理组的pH均高于8(表7)。冻融条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组的乳酸含量显著($P<0.05$)高于CK和COM处理组。无论20℃条件还是冻融条件下,LP160处理组的乙酸含量均显著低于LP157、LB248、LPE260和MIX处理组。20℃条件下,CK、LPE260和COM处理组的LA/AA显著($P<0.05$)低于其他菌株处理组;冻融条件下,各个菌株处理组的LA/AA显著($P<0.05$)高于CK组,2个温度条件下LP160处理组的LA/AA均最高。所有处理组中均未检测到丙酸和丁酸。2个温度条件下,LP157、LP160、LB248和LPE260处理组的有氧变败时长均显著($P<0.05$)高于CK、MIX和COM处理组,尤其是LP160处理组表现最优,显著($P<0.05$)高于其他处理(图2)。

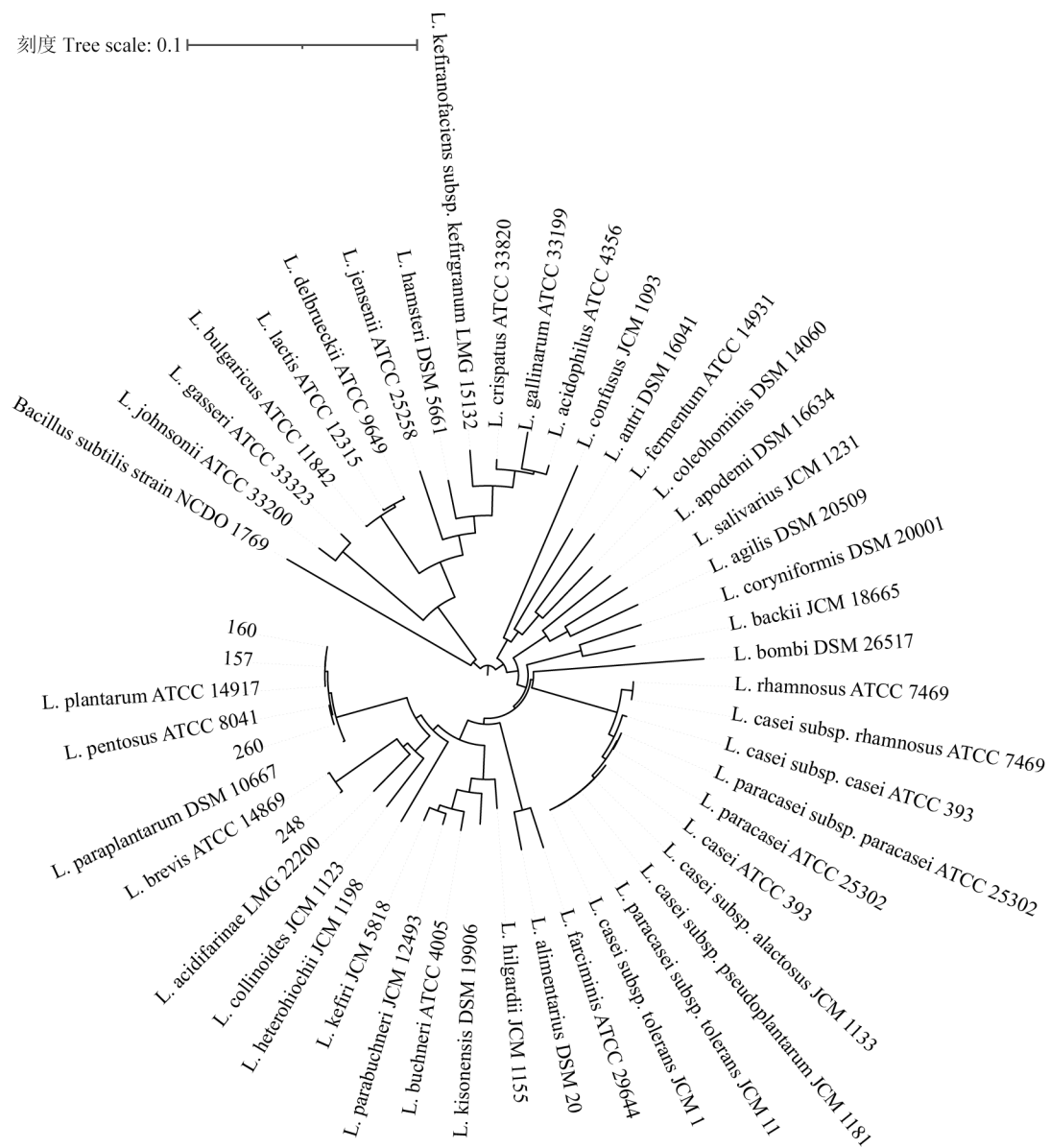


图1 乳酸菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram of lactic acid bacteria strains isolated from silages

表3 燕麦青贮原料特性

Table 3 Chemical, microbial composition of oat before ensiling

项目 Item	含量 Content
干物质 Dry matter (DM, %FW)	28.96±0.350
粗蛋白 Crude protein (CP, %DM)	11.01±0.129
灰分 Ash (%DM)	8.90±0.175
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %DM)	65.17±1.169
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %DM)	29.69±0.982
水溶性碳水化合物 Water-soluble carbohydrates (WSC, %DM)	13.30±1.050
乳酸菌 Lactic acid bacteria (lg cfu·g ⁻¹ FW, LAB)	3.70
肠杆菌 Coliform bacteria (lg cfu·g ⁻¹ FW, CB)	4.12
酵母菌 Yeast (lg cfu·g ⁻¹ FW)	2.89
霉菌 Mold (lg cfu·g ⁻¹ FW)	3.14

表 4 燕麦青贮 60 d 的发酵特性

Table 4 Fermentation characteristics of oat silage ensiled at 60 days

温度 Temperature (°C)	菌剂 Inoculation	pH	NH ₃ -N/TN (%)	乳酸 LA (mg·g ⁻¹ DM)	乙酸 AA (mg·g ⁻¹ DM)	丙酸 PA (mg·g ⁻¹ DM)	丁酸 BA (mg·g ⁻¹ DM)	LA/AA
20	对照 CK	4.59abc	3.86a	46.86g	21.95b	ND	ND	2.14g
	LP157	4.01c	1.34fgh	69.31ab	24.70ab	ND	ND	2.81def
	LP160	4.02c	1.65def	58.44d	12.60de	ND	ND	4.68a
	LB248	4.02c	1.39fgh	71.41a	27.78a	ND	ND	2.59efg
	LPE260	3.99c	1.09h	69.56ab	24.71ab	ND	ND	2.85def
	MIX	4.37abc	2.08bc	44.46g	13.46de	ND	ND	3.31cd
	COM	4.90a	1.49efg	54.27ef	18.04c	ND	ND	3.01cde
20/-5	对照 CK	4.81ab	2.33b	27.73h	6.61f	ND	ND	4.21ab
	LP157	4.00c	1.75de	56.82def	15.75cd	ND	ND	3.64bc
	LP160	4.02c	1.84cd	66.75bc	15.50cd	ND	ND	4.34a
	LB248	4.04c	1.38fgh	57.93de	17.83c	ND	ND	3.26cd
	LPE260	4.03c	1.35fgh	64.15c	22.93b	ND	ND	2.83def
	MIX	4.07c	1.24gh	53.22f	11.67e	ND	ND	4.58a
	COM	4.16bc	1.97cd	55.39def	24.16ab	ND	ND	2.32fg
标准误 SEM		0.228	0.027	0.341	0.317	ND	ND	0.054
菌剂 Inoculation (I)		*	**	**	**	ND	ND	**
温度 Temperature (T)		NS	**	**	**	ND	ND	**
I×T		NS	**	**	**	ND	ND	**

同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; NS: 不显著 Not significant; SEM: 标准误 Standard error of mean; LA: 乳酸 Lactic acid; AA: 乙酸 Acetic acid; BA: 丙酸 Butyric acid; PA: 丁酸 Propionic acid. DM: 干物质 Dry matter; TN: 总氮 Total nitrogen; ND: 没有检测到 Not detected; 下同 The same below.

表 5 燕麦青贮 60 d 后微生物计数

Table 5 Microorganism counts of oat silage ensiled at 60 days (lg cfu·g⁻¹ FW)

处理 Treatment	乳酸菌 LAB		肠杆菌 CB		酵母菌 Yeast		霉菌 Mold	
	20 °C	20 °C/-5 °C	20 °C	20 °C/-5 °C	20 °C	20 °C/-5 °C	20 °C	20 °C/-5 °C
对照 CK	4.62	4.63	ND	4.06	2.30	3.78	ND	2.00
LP157	2.95	3.32	ND	2.95	0.90	1.25	ND	ND
LP160	3.46	4.00	ND	ND	ND	1.70	ND	ND
LB248	4.21	4.03	ND	ND	0.08	0.63	ND	ND
LPE260	5.26	4.71	1.60	ND	4.29	ND	2.70	ND
MIX	4.79	4.77	1.54	ND	3.62	ND	2.48	ND
COM	5.83	4.06	4.70	ND	4.37	3.72	3.75	ND

3 讨论

3.1 抗冻融乳酸菌的筛选及鉴定

筛选出的 4 株乳酸菌有较强的耐酸、耐温(高温及低温)、耐盐特性,在冻融条件下可以正常生长,说明乳酸菌 LP157、LP160、LB248 和 LPE260 可以很好地适应青藏高原地区昼夜温差大的极端环境,适宜作为冻融条件下燕麦青贮调制的候选菌株。前期在青藏高原优质乳酸菌筛选中,张红梅^[14]从当雄地区藏嵩草(*Kobresia tibetica*)和燕麦草青贮样品中筛选出了 4 株耐低温乳酸菌,分别是植物乳杆菌、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)及棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryneformis*)。李平^[15]从川西北高寒牧区的天然青贮饲料[(老芒麦(*Elymus sibiricus*)、燕麦]中筛选出的耐低温乳酸菌分别是植物乳杆菌、粪链球菌(*Enterococcus*

表6 燕麦青贮60 d的营养品质

Table 6 Nutritional components of oat silage ensiled at 60 days

温度 Temperature (°C)	菌剂 Inoculation	干物质 DM (%FW)	干物质损失 DM loss (%)	灰分 Ash (%DM)	中性洗涤纤维 NDF (%DM)	酸性洗涤纤维 ADF (%DM)	粗蛋白 CP (%DM)	水溶性碳水化合物 WSC (%DM)
20	对照 CK	28.35f	1.22a	8.09a	54.28cd	29.76bc	9.05abcd	4.84def
	LP157	28.67ef	0.09e	7.99a	48.36e	23.01e	9.18abc	4.64efg
	LP160	29.18ef	0.39cde	7.96a	46.24e	21.26e	9.15abcd	5.36cde
	LB248	28.61ef	0.24de	7.98a	54.21cd	26.75d	9.67a	4.00fg
	LPE260	28.53ef	0.07e	8.00a	53.53d	27.84cd	9.24ab	7.70b
	MIX	29.20ef	0.12de	8.38a	56.61bcd	30.01bc	8.71bcd	6.93b
	COM	28.60ef	0.19de	7.25a	56.35bcd	29.26bcd	8.82bcd	3.73g
20/-5	对照 CK	31.38b	0.89abc	7.84a	58.45bc	31.76ab	8.78bcd	5.85c
	LP157	30.60bc	0.43cde	7.46a	59.06b	31.01b	8.55cde	5.73cd
	LP160	29.58de	0.52cde	7.98a	55.28bcd	30.44bc	8.48de	4.59efg
	LB248	31.03bc	0.37cde	7.88a	56.22bcd	31.73ab	9.36ab	4.20fg
	LPE260	32.49a	0.67bcd	7.38a	56.48bcd	29.25bcd	8.91bcd	5.92c
	MIX	32.70a	1.13ab	8.13a	63.82a	34.10a	7.76f	10.39a
	COM	30.31cd	0.49cde	7.97a	56.77bcd	30.68bc	8.06ef	5.38cde
标准误 SEM		0.090	0.045	0.370	1.340	0.930	0.050	0.300
菌剂 Inoculation (I)		**	**	NS	**	**	**	**
温度 Temperature (T)		**	**	NS	**	**	**	**
I×T		**	*	NS	**	**	NS	**

表7 燕麦青贮有氧暴露5 d后的有机酸和氨态氮含量

Table 7 Content of organic acid and ammonia nitrogen of oat silage aerobically exposed for 5 days

温度 Temperature (°C)	菌剂 Inoculation	pH	NH ₃ -N (mg·g ⁻¹ DM)	乳酸 LA (mg·g ⁻¹ DM)	乙酸 AA (mg·g ⁻¹ DM)	丙酸 PA (mg·g ⁻¹ DM)	丁酸 BA (mg·g ⁻¹ DM)	LA/AA
20	对照 CK	8.68ab	3.38bc	23.65de	13.59bc	ND	ND	1.74g
	LP157	4.24e	2.79d	41.56b	14.27b	ND	ND	2.91cd
	LP160	4.01e	1.35f	25.68d	7.36f	ND	ND	3.49b
	LB248	4.33e	1.60f	79.29a	31.92a	ND	ND	2.49e
	LPE260	8.06b	2.84d	20.31f	12.77c	ND	ND	1.59g
	MIX	8.99a	3.48bc	20.19f	9.29e	ND	ND	2.17f
	COM	8.97a	4.39a	11.00h	6.50f	ND	ND	1.69g
20/-5	对照 CK	8.79ab	4.54a	13.14gh	5.59g	ND	ND	2.35e
	LP157	6.62c	3.03cd	25.41d	9.21e	ND	ND	2.76d
	LP160	5.70d	2.22e	35.73c	5.47g	ND	ND	6.54a
	LB248	7.07c	2.59de	21.68ef	7.27f	ND	ND	2.99c
	LPE260	6.86c	3.41bc	42.24b	11.60d	ND	ND	3.64b
	MIX	8.76ab	3.53b	41.81b	11.76d	ND	ND	3.56b
	COM	8.44ab	4.30a	15.15g	5.27g	ND	ND	2.87cd
标准误 SEM		0.277	0.040	0.253	0.076	ND	ND	0.016
菌剂 Inoculation (I)		**	**	**	**	ND	ND	**
温度 Temperature (T)		**	**	**	**	ND	ND	**
I×T		**	**	**	**	ND	ND	**

faecium)、耐乙醇片球菌(*Pediococcus ethanolidurans*)和拟干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)。储徐建^[16]从泡菜中筛选出的耐低温乳酸菌有植物乳杆菌、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)和乳明串珠菌(*Leuconostoc lactis*)。与前人筛选耐低温乳酸菌研究相比,本试验筛选出的短乳杆菌 248 和戊糖乳杆菌 260 作为异型发酵乳酸菌在冻融环境下展现了相当的青贮应用潜力,而在耐低温乳酸菌研究中未见报道,且前人研究认为低温环境下同型发酵乳酸菌更适宜做青贮调制^[15],这表明菌株资源功能特性的差异值得进一步关注和挖掘。此外,本试验同样筛选到 2 株抗冻融植物乳杆菌 LP157 和 LP160,可见,植物乳杆菌作为全球使用最为广泛的青贮乳酸菌,具有较强环境适应特性和高产酸效率,在青藏高原地区青贮中有较大应用潜力,但菌株特性存在一定差异。所以,根据原料和所处环境的特性,合理开发利用乳酸菌菌剂将是不同地区生产高品质青贮的关键。

3.2 抗冻融乳酸菌对燕麦发酵品质的影响

乳酸菌特性和贮藏温度对发酵品质有很大影响,乳酸菌的演替生长及其代谢活性对于控制青贮饲料的质量和安全性至关重要,在发酵阶段乳酸菌利用原料上的可溶性糖产生有机酸,降低 pH,抑制腐败菌的生长,防止饲料变质并延长其保存时间^[24,26-27]。所以青贮的 pH 值是表征发酵程度的重要参数,由于本研究原料附生的乳酸菌较少,低于通常要求的 $5 \lg \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}^{[7]}$,所以 CK 组的发酵可能不完全, pH 较高,尤其是冻融条件下,低含量的附生乳酸菌极易造成不发酵或较低程度的发酵,不利于青贮长期保存。LP157 和 LP160 处理组虽然乳酸菌数量较少但是 pH 低,乳酸含量显著高于其他处理组,可能是这 2 株植物乳杆菌具有较高的产乳酸效率,因为在青贮过程中,乳酸菌产生的乳酸通常是青贮中浓度最高的酸,乳酸对于发酵过程中 pH 下降的贡献最大^[28]。LP157、LP160、LB248 和 LPE260 处理组在冻融条件下,通过大幅度提高乳酸、乙酸的含量,即产酸效率来降低 pH,保证发酵的正常进行,降低脱氨和蛋白质水解程度,从而降低 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量,这与前人的研究结果一致^[9,17,29]。但是,值得注意的是同型发酵乳酸菌 LP157 处理组在乳酸、乙酸含量方面与异型发酵菌 LB248 和 LPE260 很相似,尤其 LA/AA 与异型发酵菌无显著差异,所以 LP157 即使鉴定出是植物乳杆菌,但可能是兼性异型发酵乳酸菌,有研究表明植物乳杆菌同样可以在特定条件下发酵戊糖产生乙酸^[30]。也有研究认为植物乳杆菌会在缺糖原的条件下将乳酸代谢成乙酸^[31]。

3.3 抗冻融乳酸菌对青贮燕麦有氧稳定性的影响

冻融胁迫会对植物造成物理损伤,促进植物细胞养分释放^[32],从而有利于青贮过程中乳酸菌的生长,但是一遇到氧气也更容易滋生酵母菌等腐败菌^[18],所以冻融条件下燕麦青贮易出现发酵不稳定状况,本研究中冻融条件下无论发酵阶段还是有氧暴露阶段 CK 组的乳酸、乙酸含量均显著低于 20 °C 的 CK 组,说明冻融条件下燕麦青贮自然发酵不易成功,这与 Zhang 等^[29]的研究结果一致。但是,接种了抗冻融乳酸菌的处理组 LP157、LP160、LB248 和 LPE260 有氧暴露 5 d 后其 pH 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 显著低于 CK 组,且有氧变败时长显著高于 CK 组。值得注意的是,LP160 在冻融条件下表现出了优异的发酵特性和有氧稳定性,这与 Guan 等^[33]的研究结果不一致,过去很多研究中同型发酵的植物乳杆菌在有氧暴露阶段往往表现不突出,认为同型发酵乙酸含量较低,容易滋生酵母菌,从而导致青贮饲料快速腐败^[30],而异型发酵虽然会产生高的干物质损失^[6],但是会通过增加乙酸的产量来提高有氧稳定性^[34]。但是在本研究中同型发酵乳酸菌 LP160 在有氧暴露阶段 pH 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量显著低于其他处理组, LA/AA 显著高于其他处理组,有氧稳定性显著优于其他处理组,这可能与乳酸菌和青贮原料的特性有关,有待进一步研究。本研究结果较据泽亮等^[35]的研究中燕麦青贮的有氧稳定性差,这可能与有氧暴露的环境有关,本研

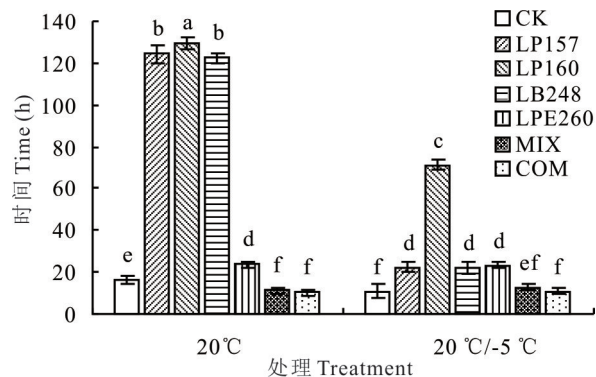


图2 燕麦青贮有氧稳定性

Fig. 2 Aerobic stability of oat silages with inoculants

不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level.

究有氧暴露阶段环境温度较高、湿度较大,研究表明,高温高湿环境更易加速青贮的有氧变败^[36]。此外,本研究中冻融条件下的干物质含量显著高于20℃条件,Li等^[37]在高温青贮中也发现了同样的结果,可能是高温或者冻融条件下植物出现脱水现象导致青贮渗出液的产生,进而出现干物质含量增加,具体原因有待深入研究。

本研究中混合菌处理组是同型发酵乳酸菌和异型发酵乳酸菌互配而成,但是效果并不理想,这与Driehuis等^[38]的研究结果相反,并没有达到两种菌结合使用的协同作用。可能是因为这2株菌筛选自不同地区,联合使用产生了拮抗作用。商业菌的效果也不佳,证实乳酸菌菌剂具有一定的地区和材料适应性^[33,39]。说明就地取材,合理开发利用优质乡土乳酸菌资源是建立当地青贮技术体系的关键环节,另外,菌种间的互作研究、组合优化和配伍禁忌的确立是混合菌应用实践的基础,值得深入探究。

4 结论

本研究从青藏高原地区筛选了4株乳酸菌,具有抗冻融,高产酸效率等特性,分别是植物乳杆菌157、植物乳杆菌160、短乳杆菌248和戊糖乳杆菌260。4株优选乳酸菌在冻融条件下能有效降低燕麦青贮pH,提高乳酸、乙酸产量,减少干物质损失,提高有氧稳定性,对青藏高原地区青贮营养保存和延长青贮货架期具有积极的作用。

参考文献 References:

- [1] Jia Z F, Ma X, Ju Z L, *et al.* Interactive effects of nitrogen and sowing rate on grain yield and panicle development of oat. *Grassland and Turf*, 2021, 41(4): 120—127.
贾志锋, 马祥, 琚泽亮, 等. 氮肥与播种量互作对燕麦穗部性状及种子产量的影响. *草原与草坪*, 2021, 41(4): 120—127.
- [2] Yang Y G, Cheng T L, Yang X J, *et al.* Effects of different growth stage of three oat cultivars on the nutritive value of silage. *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(4): 683—688.
杨云贵, 程天亮, 杨雪娇, 等. 3个燕麦品种不同收获期对青贮饲草营养价值的影响. *草地学报*, 2013, 21(4): 683—688.
- [3] Wang C, Zheng M, Wu S, *et al.* Effects of gallic acid on fermentation parameters, protein fraction, and bacterial community of whole plant soybean silage. *Frontiers in Microbiology*, 2021, DOI: 10.3389/fmicb.2021.662966.
- [4] Bilal A K, Adnan M, Rehman F U, *et al.* Role of silage in agriculture: A review. *Green Reports*, 2021, 2(4): 9—12.
- [5] Elgersma A, Soegaard K, Jensen S K. Fatty acids, α -tocopherol, β -carotene, and lutein contents in forage legumes, forbs, and a grass-clover mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(49): 11913—11920.
- [6] McDonald P, Henderson A R, Heron S. The biochemistry of silage. *Animal Feed Science and Technology*, 1991, 7(3): 317—318.
- [7] Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 444—451.
- [8] Zhou Y, Drouin P, Lafreniere C. Effect of temperature (5—25℃) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 657—671.
- [9] Li X, Chen F, Wang X, *et al.* Impacts of low temperature and ensiling period on the bacterial community of oat silage by SMRT. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 274.
- [10] Guan H, Shuai Y, Yan Y, *et al.* Microbial community and fermentation dynamics of corn silage prepared with heat-resistant lactic acid bacteria in a hot environment. *Microorganisms*, 2020, 8(5): <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050719>.
- [11] Yang L, Yuan X, Li J, *et al.* Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresource Technology*, 2018, 275: 280—287.
- [12] Tian J, Zhang J G. Research progress in the distribution of lactic acid bacteria on the surface of plants. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(9): 3—10.
田静, 张建国. 植物表面乳酸菌分布研究进展. *生物技术通报*, 2021, 37(9): 3—10.
- [13] Ju Z L, Zhao G Q, Chai J K, *et al.* Comprehensive evaluation of nutritional value and silage fermentation quality of different oat varieties in centra Gansu Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(9): 77—86.
琚泽亮, 赵桂琴, 柴继宽, 等. 不同燕麦品种在甘肃中部的营养价值及青贮发酵品质综合评价. *草业学报*, 2019, 28(9): 77—86.
- [14] 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. 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. 兰州: 兰州大学, 2016.

- [15] Li P. Study on ensiling technology of siberian wildrye and oat in alpine pastoral area of Northwest Sichuan Province. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
李平. 改善川西北高寒牧区老芒麦和燕麦青贮发酵品质的研究. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [16] Chu X J. Isolation of low temperature lactobacillus and application on silage of six raw. Xining: Qinghai University, 2014.
储徐建. 耐低温乳酸菌的筛选与六种原料青贮中的应用. 西宁: 青海大学, 2014.
- [17] Jing P X, Zhang H M, Cao L, *et al.* Application of lactic acid bacteria to *Elymus nutans* silage from the Tibetan Plateau. Pratacultural Science, 2017, 34(11): 2396—2402.
荆佩欣, 张红梅, 曹蕾, 等. 青藏高原耐低温乳酸菌在垂穗披碱草青贮中的应用. 草业科学, 2017, 34(11): 2396—2402.
- [18] Dong Z, Li J, Chen L, *et al.* Effects of freeze-thaw event on microbial community dynamics during red clover ensiling. Frontiers in Microbiology, 2019, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01559.
- [19] Cai Y M, 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. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2982—2987.
- [20] Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis (the 15th edition). Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [21] Ning Z L, Chen H J, Wang Z N, *et al.* A study on the dynamic change of gross caloric value and ash content of the several tall grasses. Acta Prataculturæ Sinica, 2010, 19(2): 241—247.
宁祖林, 陈慧娟, 王珠娜, 等. 几种高大禾草热值和灰分动态变化研究. 草业学报, 2010, 19(2): 241—247.
- [22] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583—3597.
- [23] 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.
- [24] Yuan J, Ma R R, Zhang W J, *et al.* Screening of superior lactic acid bacteria from natural *Lolium multiflorum* silage and their effects on silage quality. Acta Prataculturæ Sinica, 2021, 30(11): 132—143.
袁洁, 马冉冉, 张文洁, 等. 自然青贮多花黑麦草优良乳酸菌的筛选及对多花黑麦草青贮品质的影响. 草业学报, 2021, 30(11): 132—143.
- [25] Ranjit N K, Jr K L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Journal of Dairy Science, 2000, 83(3): 526—535.
- [26] Weinberg Z G, Szakacs G, Ashbell G, *et al.* The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4): 561—566.
- [27] Driehuis F, Wilkinson J M, Jiang Y, *et al.* Silage review: Animal and human health risks from silage. Journal of Dairy Science, 2018, 101(5): 4093—4110.
- [28] Kung L J, Shaver R D, Grant R J, *et al.* Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. Journal of Dairy Science, 2018, 101(5): 4020—4033.
- [29] Zhang M, Wang L, Wu G, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* on the fermentation profile and microbiological composition of wheat fermented silage under the freezing and thawing low temperatures. Frontiers in Microbiology, 2021, DOI: 10.3389/fmicb.2021.671287.
- [30] Muck R E, Nadeau E M G, McAllister T A, *et al.* Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. Journal of Dairy Science, 2018, 101(5): 3980—4000.
- [31] Lindgren S E, Axelsson L T, Mcfeeters R F. Anaerobic l-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiology Letters, 1990, 66(1/2/3): 209—213.
- [32] Phalakornkule C, Nuchdang S, Khemkhao M, *et al.* Effect of freeze—thaw process on physical properties, microbial activities and population structures of anaerobic sludge. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2017, 123(4): 474—481.
- [33] Guan H, Ke W, Yan Y, *et al.* Screening of natural lactic acid bacteria with potential effect on silage fermentation, aerobic stability and aflatoxin B1 in hot and humid area. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(5): 1301—1311.
- [34] Driehuis F, Oude Elferink S J W H, Spoelstra S F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(4): 583—594.
- [35] Ju Z L, Zhao G Q, Chai J K. Effects of temperature and lactic acid bacteria additives on fermentation quality and aerobic stability of oat silage. Grassland and Turf, 2021, 41(2): 53—59, 69.

- 据泽亮, 赵桂琴, 柴继宽. 温度和乳酸菌添加剂对燕麦青贮发酵品质及氧稳定性的影响. 草原与草坪, 2021, 41(2): 53—59, 69.
- [36] Kim S C, Adesogan A T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(8): 3122—3132.
- [37] Li F, Ding Z, Ke W, *et al.* Ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria and cellulase pretreatments of corn stalk silage at two different temperatures: Ensiling characteristics, carbohydrates composition and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 2019, 282: 211—221.
- [38] Driehuis F S, 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 and Forage Science*, 2001, 56: 330—343.
- [39] Zhang J G, Cai Y, Kobayashi R, *et al.* Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2000, 80(10): 1455—1460.