

# 附生微生物对青贮发酵品质和有氧稳定性的影响

黄峰 李浩 王坤 周晓康 顾啟超 张露 张洁 易思宇 邹彩霞\*

(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004)

**摘要:** 本试验旨在研究附生微生物对青贮发酵品质和有氧稳定性的影响。选取玉米秸秆、象草和甘蔗尾为研究对象,通过高速离心(15 000×g, 90 min)3种新鲜青贮原料微生物悬浮液得到其附生微生物。将新鲜青贮原料进行粉碎,在65℃加热3h接着105℃加热15h进行灭菌。采用3(灭菌原料)×3(附生微生物)试验设计,重构青贮时,每种重构青贮饲料干物质保持在鲜重的40%。试验共分为9个处理,每个处理3个重复。所有处理样品均密封青贮65d。青贮完成后,测定各处理中pH、常规营养成分和挥发性脂肪酸含量,并进行8d的有氧稳定性试验。结果表明:1)以灭菌玉米秸秆为发酵底物时,与玉米秸秆和象草附生微生物相比,添加甘蔗尾附生微生物极显著提高了水溶性碳水化合物(WSC)含量( $P<0.01$ ),增加了丙酸含量( $P>0.05$ ),但极显著降低了乳酸和乙酸含量( $P<0.01$ )。2)以灭菌象草为发酵底物时,与玉米秸秆和象草附生微生物相比,添加甘蔗尾附生微生物极显著提高了粗蛋白质含量( $P<0.01$ ),显著提高了WSC含量( $P<0.05$ )。然而,与象草附生微生物相比,添加玉米秸秆和甘蔗尾附生微生物显著提高了乳酸含量( $P<0.05$ )。3)以灭菌甘蔗尾为发酵底物时,与象草和甘蔗尾附生微生物相比,添加玉米秸秆附生微生物极显著增加了乳酸含量( $P<0.01$ )。4)添加玉米秸秆附生微生物可以提高象草青贮原料的有氧稳定性。综上所述,玉米秸秆附生微生物提高了试验中3种青贮原料中乳酸和乙酸含量,且对象草青贮原料有氧稳定性产生积极的影响。

**关键词:** 青贮饲料;附生微生物;发酵品质;有氧稳定性

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)12-5976-09

在我国南方地区,甘蔗尾和象草是反刍动物重要的青绿饲料。由于华南地区长期炎热、环境潮湿,对于青贮饲料营养物质的保存来说,青贮是最有效的方法。自然青贮发酵过程中,植物表面的附生乳酸菌(LAB)在厌氧条件下将水溶性碳水化合物(WSC)转化为有机酸(主要为乳酸),快速降低pH,抑制不良微生物的生长,从而达到长期保存的目的<sup>[1-2]</sup>。

青贮饲料的发酵特性影响干物质(DM)摄入量以及动物生产性能<sup>[3]</sup>。青贮饲料的发酵品质取决于多种因素,包括青贮管理技术、青贮饲料种

类。然而,即使在青贮管理很好的条件下,青贮产物的变化也是很大,而且很难解释<sup>[4]</sup>。Oliveira等<sup>[5]</sup>对130篇文章的荟萃分析显示,青贮饲料中乳酸含量的增加以及丁酸和氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ )含量的减少不受青贮饲料种类的影响。青贮饲料表面含有复杂的微生物群落,研究人员对青贮饲料表面附生微生物进行了研究,结果表明附生微生物主要包括乳酸菌、酵母菌、霉菌和其他好氧细菌等,其中,乳酸菌数量存在很大的差异<sup>[6]</sup>。乳酸菌发酵有利于改善和保存青贮饲料的营养成分。乳酸菌的代谢物中超过70%是乳酸,同时还会产生

收稿日期:2020-05-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31860661)

作者简介:黄峰(1990—),男,河南商丘人,硕士研究生,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: 854267364@qq.com

\*通信作者:邹彩霞,研究员,博士生导师,E-mail: caixiazou2002@hotmail.com

乙酸、细菌素和乙醇等产物。乙酸和细菌素可以有效抑制腐败微生物的生长繁殖,从而提高青贮饲料的有氧稳定性<sup>[7]</sup>。新鲜象草、甘蔗和玉米中检测的乳酸菌数量分别为  $10^4$ 、 $10^5$  和  $10^7$  CFU/g 左右<sup>[8-10]</sup>。然而,这些青贮饲料表面附生微生物对青贮发酵品质和有氧稳定性的影响尚未见报道。

Mogodiniyai 等<sup>[11]</sup>报道了一种研究青贮饲料灭菌后重新构贮的新方法。与自然青贮牧草相比,将收集的母本菌群重新添加到灭菌牧草中,最终的青贮质量以及微生物种群相似。因此,本试验采用此种方法,旨在探索新鲜玉米秸秆、象草和甘蔗尾表面附生微生物对青贮发酵品质和有氧稳定性的影响,为研发专用的微生物添加剂提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

新鲜玉米秸秆、象草和甘蔗尾均来自广西大学农学院试验田,对 3 种青贮原料进行人工切割至 2~3 cm,立即 4 °C 冷藏。将每种冷藏的青贮原料分为 2 份:取每种原料 400 g 在 65 °C 干燥 48 h;

取每种原料 200 g 用于提取其表面附生微生物。

### 1.2 附生微生物的收集

根据 Mogodiniyai 等<sup>[12]</sup>方法来收集植物表面的附生微生物,操作步骤如下:取每种青贮原料 200 g 分别放入 3 瓶装有 900 mL 的林格试液中,浸泡 1 h,试验室振荡器振荡 2 min。用 2 层纱布对悬浮液进行过滤,得到过滤液 850 mL,过滤的纱布浸泡在无菌超纯水中,4 °C 保存备用。玉米秸秆、象草和甘蔗尾的悬浮液中主要细菌数量如表 1 所示。为了最大程度地回收微生物和减少悬浮液体积,取悬浮液进行离心,15 000×g 离心 90 min。丢弃上层液体,将沉淀重新溶解于 15 mL 林格试液中,4 °C 保存过夜。

### 1.3 青贮原料灭菌

根据 Mogodiniyai 等<sup>[12]</sup>方法进行青贮原料灭菌。操作步骤如下:取试验 1.1 中预先干燥好的青贮原料 100 g,用粉碎机进行粉碎,过 40 目筛,取其中 80 g 放入灭菌的锥形瓶中,用锡箔纸进行封口(不密封),在烘箱中 60 °C 干燥 3 h,接着 105 °C 干燥 15 h。灭菌完成后,用锡箔纸将瓶口密封,冷却至室温备用。

表 1 青贮原料表面附生微生物种类及数量

Table 1 Epiphytic microorganism species and numbers of silage materials surface lg(CFU/g FW)

项目 Items	甘蔗尾 Sugarcane top	象草 Elephant grass	玉米秸秆 Maize straw
乳酸菌 Lactic acid bacteria	5.45	5.32	6.23
酵母菌及霉菌 Yeast and mold	5.67	5.29	5.71
好氧性细菌 Aerobic bacteria	6.77	6.43	6.82

### 1.4 重构青贮饲料

玉米秸秆、象草和甘蔗尾 3 种青贮原料的 DM 含量在 26~34 g 变化,因此,在重贮时统一认定新鲜青贮原料的 DM 含量为 30 g。为防止水分过多造成青贮饲料发酵失败以及青贮原料表面附生微生物在收集时可能会造成一定的损失,在重构青贮前期,附生微生物数量繁殖到与原始状态大致相同时,为了保证 DM 含量不低于自然青贮水平,所以适当的提高了重构青贮饲料中 DM 含量为 40%<sup>[12]</sup>。将离心浓缩的玉米秸秆、象草和甘蔗尾 3 种青贮原料的附生微生物(15 mL)分别平均等分为 3 份(5 mL/份),按照 3(附生微生物)×3(灭菌青贮原料)试验设计进行重构青贮,共 9 个处理,3 种青贮原料 5 mL 悬浮液中主要附生微生物

数量如表 2 所示,经过超纯水稀释后添加到 26 g 灭菌的青贮原料中,加浸泡纱布的超纯水使其鲜重达到 66 g(约 400 g DM/kg 鲜重)。大约 65 g 重构青贮饲料被青贮在 80 mL 青贮瓶中。每个处理设置 3 个重复,用封口膜缠绕密封青贮瓶,避光放置于室内 65 d。

### 1.5 测定指标及方法

#### 1.5.1 常规营养成分的测定

取适量高温灭菌前后的饲料样品,采用蒽酮硫酸比色法分析 WSC 含量<sup>[13]</sup>;采用全自动凯氏定氮仪测定粗蛋白质(CP)含量<sup>[14]</sup>;采用全自动凯氏定氮仪测定酸性洗涤不溶氮(ADIN)含量<sup>[15]</sup>;采用滴定法测定青贮饲料的缓冲力(BC)<sup>[16]</sup>。

表2 青贮原料5 mL悬浮液中主要附生微生物数量

Table 2 Number of main epiphytic microorganism in 5 mL suspension of silage materials lg(CFU/mL)

项目 Items	甘蔗尾 Sugarcane top	象草 Elephant grass	玉米秸秆 Maize straw
乳酸菌 Lactic acid bacteria	7.05	6.92	7.83
酵母菌及霉菌 Yeast and mold	7.27	6.89	7.31
好氧性细菌 Aerobic bacteria	8.37	8.03	8.42

青贮完成后,从各处理中分别取青贮样品15 g,65℃干燥24 h测定DM含量;采用半自动纤维测定仪测定酸性洗涤纤维(ADF)和中性洗涤纤维(NDF)含量<sup>[17]</sup>;按照上述方法测定CP、WSC含量。

### 1.5.2 发酵品质和微生物数量的测定

青贮结束后,取15 g样品放入135 mL林格试液中,浸泡30 min,用搅拌器均匀搅拌2 min,用纱布过滤青贮液,立即测定pH。青贮液分为2份:一份采用岛津GC-2014气相色谱测定乙酸、丙酸和乙醇含量<sup>[18]</sup>;采用苯酚-次氯酸钠比色法测定NH<sub>3</sub>-N含量<sup>[19]</sup>;采用对羟基联苯比色法测定青贮发酵饲料中乳酸含量<sup>[20]</sup>;按照上述方法测定WSC含量;另一份滤液进行10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup>一系列的稀释,采用平板计数法测定微生物的数量。在添加放线菌酮(200 μg/mL)的MRS肉汤琼脂培养基中检测乳酸菌数量,再在灭菌酒石酸酸化pH至3.5的马铃薯琼脂培养基中检测酵母菌数量。乳酸菌MRS琼脂平板在37℃厌氧条件下培养24~48 h,酵母菌马铃薯琼脂平板在37℃下培养48~72 h。

### 1.5.3 有氧稳定性的测定

青贮65 d后,每个青贮瓶中取30 g样品放入干净的80 mL青贮瓶中,覆盖2层纱布,在室温下保存8 d。每4 d进行1次取样(10 g),测定pH,分析乳酸含量以及酵母菌的数量。有氧稳定性采用pH等指标进行分析,当pH<0.5单位的变化被认为是稳定<sup>[21]</sup>。

## 1.6 数据统计分析

青贮饲料中微生物种群计数进行对数转换lg(CFU/g FW)。采用SPSS 22.0软件中的单因素方差分析对青贮发酵参数进行评估。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 高温灭菌对青贮原料常规营养成分的影响

如表3所示,高温灭菌在一定程度上改变了

青贮原料的特性,高温灭菌极显著降低了甘蔗尾和象草中的WSC含量( $P<0.01$ ),而灭菌前后玉米秸秆中WSC含量变化不显著( $P>0.05$ )。高温灭菌极显著增加了青贮原料中ADIN含量( $P<0.01$ ),CP含量的变化因原料样品而异。然而,3种青贮原料中BC均不受高温灭菌的影响( $P>0.05$ )。

### 2.2 附生微生物对青贮原料营养成分的影响

如表4所示,重构青贮65 d时,以灭菌玉米秸秆为发酵底物时,象草附生微生物极显著提高了青贮玉米秸秆中ADF和NDF含量( $P<0.01$ ),同时,极显著降低了WSC含量( $P<0.01$ );甘蔗尾附生微生物极显著提高了青贮玉米秸秆中WSC含量( $P<0.01$ );玉米秸秆附生微生物处理中DM含量显著低于象草和甘蔗尾附生微生物处理( $P<0.05$ )。以灭菌象草为发酵底物时,玉米秸秆附生微生物极显著降低了青贮象草中ADF和NDF含量( $P<0.01$ ),且WSC含量极显著低于象草和甘蔗尾附生微生物处理( $P<0.01$ );甘蔗尾附生微生物极显著提高了青贮象草中CP和WSC含量( $P<0.01$ )。以灭菌甘蔗尾为发酵底物时,玉米秸秆附生微生物处理中DM含量显著低于其他2个处理( $P<0.05$ );象草附生微生物提高了青贮甘蔗尾中WSC含量,但差异不显著( $P>0.05$ )。

### 2.3 附生微生物对青贮原料发酵参数的影响

如表5所示,以玉米秸秆为发酵底物时,与玉米秸秆附生微生物处理相比,甘蔗尾附生菌极显著降低了青贮玉米中乳酸含量( $P<0.01$ ),而增加了丙酸含量,但差异不显著( $P>0.05$ );象草附生菌增加了青贮玉米秸秆中NH<sub>3</sub>-N含量,但差异不显著( $P>0.05$ )。以象草为发酵底物时,与象草附生微生物处理相比,玉米秸秆附生菌极显著增加了青贮象草中乳酸和乙酸含量( $P<0.01$ ),同时,增加了丙酸含量,但差异不显著( $P>0.05$ );甘蔗尾附生菌极显著增加了青贮象草中乳酸含量( $P<0.01$ )。此外,乙酸和丙酸含量增加,但差异不显著( $P>$

0.05)。以甘蔗尾为发酵底物时,与甘蔗尾附生微生物处理相比,玉米秸秆附生菌极显著增加了青

贮甘蔗尾中乳酸的含量( $P<0.01$ ),也增加了乙酸和丙酸含量,但差异不显著( $P>0.05$ )。

表 3 高温处理(60 °C 3 h+105 °C 15 h)对不同青贮原料常规营养成分的影响

Table 3 Effects of high temperature treatment (60 °C 3 h+105 °C 15 h) on conventional nutritional composition of different silage materials

项目 Items	甘蔗尾 Sugarcane top		象草 Elephant grass		玉米秸秆 Maize straw		SEM	P 值 P-value
	对照 Control	高温灭菌 High temperature sterilization	对照 Control	高温灭菌 High temperature sterilization	对照 Control	高温灭菌 High temperature sterilization		
可溶性碳水化合物 WSC/(g/kg FW)	117.41 <sup>Bb</sup>	96.74 <sup>Bc</sup>	100.23 <sup>Bc</sup>	78.51 <sup>Cd</sup>	183.63 <sup>Aa</sup>	174.61 <sup>Aa</sup>	9.73	<0.01
粗蛋白质 CP/(g/kg DM)	66.60 <sup>Bd</sup>	60.15 <sup>Bf</sup>	110.79 <sup>Aa</sup>	101.40 <sup>Ab</sup>	61.85 <sup>Bc</sup>	69.78 <sup>Bc</sup>	4.85	<0.01
缓冲力 BC/(mE/kg DM)	196.85 <sup>Aa</sup>	204.93 <sup>Aa</sup>	189.30 <sup>Ab</sup>	186.54 <sup>Ab</sup>	154.96 <sup>Bc</sup>	168.68 <sup>Bc</sup>	4.25	<0.01
酸性洗涤不溶氮 ADIN/(g/kg TN)	34.06 <sup>Cd</sup>	39.95 <sup>BCc</sup>	47.81 <sup>Bb</sup>	72.38 <sup>Aa</sup>	28.89 <sup>Cc</sup>	35.68 <sup>Cd</sup>	3.44	<0.01

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。表 4、表 5、表 6 同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P<0.01$ ). The same as Table 4, Table 5 and Table 6.

表 4 附生微生物对不同青贮原料营养成分的影响

Table 4 Effects of epibiotic microorganisms on nutritional components of different silage materials

处理 Treatments	干物质 DM/(g/kg FW)	酸性洗涤纤维 ADF/(g/kg DM)	中性洗涤纤维 NDF/(g/kg DM)	粗蛋白质 CP/(g/kg DM)	可溶性碳水化合物 WSC/(g/kg DM)
M×M <sub>1</sub>	36.54 <sup>Bc</sup>	315.06 <sup>Bc</sup>	587.52 <sup>Bd</sup>	78.00 <sup>Bbc</sup>	28.96 <sup>Bb</sup>
M×E <sub>1</sub>	39.31 <sup>Aa</sup>	367.66 <sup>Aa</sup>	660.43 <sup>Aa</sup>	69.54 <sup>Cdc</sup>	9.96 <sup>Cc</sup>
M×S <sub>1</sub>	38.94 <sup>Aa</sup>	317.28 <sup>Bc</sup>	564.75 <sup>Bc</sup>	81.94 <sup>Bb</sup>	44.72 <sup>Aa</sup>
E×M <sub>1</sub>	36.57 <sup>Bc</sup>	349.82 <sup>Ab</sup>	585.68 <sup>Bd</sup>	71.17 <sup>BCcd</sup>	9.29 <sup>Cc</sup>
E×E <sub>1</sub>	37.42 <sup>Abc</sup>	369.87 <sup>Aa</sup>	622.22 <sup>Bc</sup>	72.26 <sup>BCd</sup>	14.82 <sup>Cd</sup>
E×S <sub>1</sub>	38.28 <sup>Aab</sup>	365.03 <sup>Aa</sup>	596.31 <sup>Bd</sup>	90.39 <sup>Aa</sup>	20.21 <sup>BCc</sup>
S×M <sub>1</sub>	34.73 <sup>Bd</sup>	346.31 <sup>Ab</sup>	632.00 <sup>ABbc</sup>	66.47 <sup>Cc</sup>	18.22 <sup>Ccd</sup>
S×E <sub>1</sub>	37.50 <sup>Abc</sup>	339.70 <sup>Ab</sup>	641.28 <sup>Ab</sup>	66.46 <sup>Cc</sup>	19.31 <sup>BCc</sup>
S×S <sub>1</sub>	38.69 <sup>Aa</sup>	350.38 <sup>Ab</sup>	650.60 <sup>Aab</sup>	73.74 <sup>BCcd</sup>	18.34 <sup>BCcd</sup>
SEM	2.03	0.39	0.63	0.15	2.03
P 值 P-value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

M 表示灭菌玉米秸秆原料;E 表示灭菌象草原料;S 表示灭菌甘蔗尾原料。M<sub>1</sub> 表示玉米秸秆附生微生物;E<sub>1</sub> 表示象草附生微生物;S<sub>1</sub> 表示甘蔗尾附生微生物。FW 表示鲜重。表 5、表 6 同。

M represented sterilized corn straw raw material; E represented sterilized elephant grass raw material; S represented sterilized sugarcane tail material. M<sub>1</sub> represented epiphytic microorganisms of corn straw; E<sub>1</sub> represented epiphytic microorganisms of elephant grass; S<sub>1</sub> represented epiphytes microorganisms of sugarcane top. The same as Table 5 and Table 6.

表5 附生微生物对不同青贮原料发酵参数的影响

Table 5 Effects of epibiotic microorganisms on fermentation parameters of different silage materials

处理 Treatments	pH	乳酸 Lactic acid/ (g/kg DM)	乙酸 Acetic acid/ (g/kg DM)	丙酸 Propionic acid/ (g/kg DM)	丁酸 Butyric acid/ (g/kg DM)	氨态氮 NH <sub>3</sub> -N/ (g/kg DM)	乙醇 Ethanol/ % DM	乳酸菌 LAB/ lg(CFU/g FM)	酵母菌 Yeasts/ lg(CFU/g FM)
M×M <sub>1</sub>	4.10 <sup>Bbc</sup>	50.82 <sup>Aa</sup>	10.58 <sup>Bb</sup>	2.33	NS	5.57	7.22 <sup>b</sup>	8.03	<2.00
M×E <sub>1</sub>	4.10 <sup>Bbc</sup>	46.62 <sup>ABa</sup>	10.85 <sup>Bb</sup>	2.16	NS	6.92	6.21 <sup>b</sup>	7.38	<2.00
M×S <sub>1</sub>	4.25 <sup>ABab</sup>	34.00 <sup>CDc</sup>	8.21 <sup>Cb</sup>	2.51	NS	5.33	9.27 <sup>a</sup>	7.82	2.53
E×M <sub>1</sub>	4.11 <sup>Bbc</sup>	48.81 <sup>Aa</sup>	14.54 <sup>Aa</sup>	2.44	NS	7.06	5.38 <sup>b</sup>	7.76	<2.00
E×E <sub>1</sub>	4.16 <sup>ABbc</sup>	41.24 <sup>BCb</sup>	9.22 <sup>BCb</sup>	1.85	NS	7.91	6.11 <sup>b</sup>	7.45	2.85
E×S <sub>1</sub>	4.04 <sup>Bc</sup>	46.52 <sup>ABa</sup>	10.91 <sup>Bb</sup>	2.55	NS	8.24	9.38 <sup>a</sup>	7.12	<2.00
S×M <sub>1</sub>	4.27 <sup>ABab</sup>	46.94 <sup>Aa</sup>	15.88 <sup>Aa</sup>	2.78	NS	5.32	6.54 <sup>b</sup>	7.99	<2.00
S×E <sub>1</sub>	4.31 <sup>Aa</sup>	30.60 <sup>Dc</sup>	14.52 <sup>Aa</sup>	2.24	NS	6.76	5.12 <sup>b</sup>	7.31	<2.00
S×S <sub>1</sub>	4.32 <sup>Aa</sup>	32.28 <sup>Dc</sup>	15.22 <sup>Aa</sup>	2.66	NS	5.29	10.73 <sup>a</sup>	7.26	<2.00
SEM	0.02	2.50	0.60	0.05	ND	0.30	0.49	0.72	<2.00
P值 P-value	<0.01	<0.01	<0.01	0.63	ND	0.07	0.01	ND	ND

NS表示未能检测出。ND表示未检测。表6同。NS indicated that it was undetected. ND mean not detected. The same as Table 6.

## 2.4 附生微生物对青贮原料暴露于空气后 pH、乳酸含量和酵母菌数量的影响

如表6所示,在有氧暴露阶段,各处理中的pH普遍呈现出逐渐升高的趋势。有氧暴露4d时, M×M<sub>1</sub>处理pH变化大于0.5个单位,其余各处理pH变化小于0.5个单位。E×S<sub>1</sub>处理表现出最低的pH和酵母菌数量。然而, M×S<sub>1</sub>处理pH表现

出小于初始值的状态。M×E<sub>1</sub>和E×S<sub>1</sub>处理在暴露4d时pH基本上处于稳定状态,乳酸含量下降缓慢,且酵母菌数量低于1×10<sup>5</sup> CFU/g FW。在有氧暴露8d时,除E×M<sub>1</sub>处理pH变化小于0.5个单位,其余各处理pH变化均大于0.5个单位,且酵母菌数量都达到了1×10<sup>8</sup> CFU/g FW以上。

表6 附生微生物对青贮原料有氧暴露中的pH、乳酸含量和酵母菌数量的影响

Table 6 Effects of epibiotic microorganisms on pH, lactic acid content and yeast numbers in aerobic exposure to silage materials

处理 Treatments	暴露天数 Days of exposure/d								
	0			4			8		
	pH	乳酸 Lactic acid/(g/kg DM)	酵母菌 Yeasts/lg(CFU/g FM)	pH	乳酸 Lactic acid/(g/kg DM)	酵母菌 Yeasts/lg(CFU/g FM)	pH	乳酸 Lactic acid/(g/kg DM)	酵母菌 Yeasts/lg(CFU/g FM)
M×M <sub>1</sub>	4.10 <sup>Bbc</sup>	4.92 <sup>Aa</sup>	7.29 <sup>Aa</sup>	50.82 <sup>Aa</sup>	29.89 <sup>Bc</sup>	9.66 <sup>BCc</sup>	<2.00	7.46	8.57
M×E <sub>1</sub>	4.10 <sup>Bbc</sup>	4.12 <sup>Cd</sup>	6.58 <sup>ABb</sup>	46.62 <sup>ABa</sup>	32.34 <sup>ABbc</sup>	11.42 <sup>Bb</sup>	<2.00	4.37	8.13
M×S <sub>1</sub>	4.25 <sup>ABab</sup>	4.13 <sup>Cd</sup>	4.88 <sup>CDd</sup>	34.00 <sup>CDc</sup>	35.72 <sup>Aa</sup>	18.29 <sup>Aa</sup>	2.53	4.80	7.98
E×M <sub>1</sub>	4.11 <sup>Bbc</sup>	4.25 <sup>Ccd</sup>	4.13 <sup>De</sup>	48.81 <sup>Aa</sup>	34.49 <sup>Ab</sup>	9.90 <sup>Bc</sup>	<2.00	4.55	4.65
E×E <sub>1</sub>	4.16 <sup>ABbc</sup>	4.66 <sup>ABb</sup>	5.08 <sup>Cd</sup>	41.24 <sup>BCb</sup>	30.47 <sup>Bc</sup>	10.03 <sup>Bc</sup>	2.85	7.90	8.82
E×S <sub>1</sub>	4.04 <sup>Bc</sup>	4.07 <sup>Cd</sup>	5.43 <sup>Ccd</sup>	46.52 <sup>ABa</sup>	31.18 <sup>Bc</sup>	9.03 <sup>BCcd</sup>	<2.00	3.88	8.28
S×M <sub>1</sub>	4.27 <sup>ABab</sup>	4.45 <sup>BCbc</sup>	5.84 <sup>BCc</sup>	46.94 <sup>Aa</sup>	35.88 <sup>Aa</sup>	11.64 <sup>Bb</sup>	<2.00	7.66	8.01
S×E <sub>1</sub>	4.31 <sup>Aa</sup>	4.50 <sup>BCbc</sup>	5.24 <sup>Cd</sup>	30.60 <sup>Dc</sup>	20.64 <sup>Cd</sup>	7.96 <sup>Cd</sup>	<2.00	7.34	8.35
S×S <sub>1</sub>	4.32 <sup>Aa</sup>	4.63 <sup>Bb</sup>	5.95 <sup>BCc</sup>	32.28 <sup>Dc</sup>	19.61 <sup>Cd</sup>	7.79 <sup>Cd</sup>	<2.00	8.58	8.77
SEM	0.02	0.06	0.18	2.5	1.15	0.6	ND	ND	ND
P值 P-value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ND	ND	ND

### 3 讨 论

#### 3.1 高温对青贮原料的影响

试验中, 考虑到收集青贮原料表面附生微生物数量比实际低, 在初始阶段后, 重构青贮饲料依然会产生与自然青贮发酵相似的结果, 因此, 重构青贮增加了青贮饲料中 DM 含量。从表 3 可以看到, 高温灭菌对青贮原料有一定的影响。但是, 高温灭菌对青贮饲料的 BC 没有影响, 这表明高温灭菌后样品与自然样品有着相似的发酵特性。

#### 3.2 附生微生物对青贮原料发酵营养成分的影响

本试验中, 所有的处理中均以玉米秸秆和甘蔗尾附生微生物处理中 ADF 和 NDF 含量最低, 这表明了玉米秸秆和甘蔗尾附生微生物能够有效降解青贮饲料中 ADF 和 NDF 含量。任海伟等<sup>[22]</sup>研究发现, 在玉米秸秆中添加乳酸菌青贮前期(0~40 d)可以有效降低 NDF 含量。席兴军等<sup>[23]</sup>也报道了青贮玉米秸秆中添加乳酸菌和纤维素酶可以有效降低 NDF 含量。乳酸菌添加剂可以降解青贮饲料中纤维含量或许归因于其可以产生一些降解纤维素的酶<sup>[24]</sup>。我们推测玉米秸秆和甘蔗尾附生微生物或许可以产生降解纤维素的酶, 这需要进一步的研究。本试验中, 添加甘蔗尾附生微生物的处理中 DM 和 CP 含量均高于其他各处理。Muck 等<sup>[25]</sup>总结了 2013—2017 年关于添加剂的研究成果, 该研究报告同型发酵乳酸菌可以明显降低 DM 损失率, 异型发酵乳酸菌则是起到相反的作用。华金玲<sup>[26]</sup>研究发现, 乳酸菌添加剂可以快速降低青贮 pH, 抑制好氧微生物的生长繁殖, 从而降低 CP 水解损失。本研究中, 甘蔗尾附生微生物提高了玉米秸秆青贮中 CP 含量, 但差异不显著。然而, 其显著提高了象草青贮中 CP 含量。这表明甘蔗尾附生微生物能够快速降低玉米秸秆和象草青贮中 pH, 从而抑制蛋白酶的活性和不良微生物的生长繁殖。我们推测甘蔗尾附生微生物处理青贮后期同型发酵乳酸菌或许占有更高的比例。

#### 3.3 附生微生物对青贮原料发酵参数的影响

青贮饲料中有机酸含量, 尤其是乳酸含量, 是衡量青贮品质的重要指标。本试验中, 玉米秸秆附生微生物处理中乳酸和乙酸含量普遍高于其他处理。Mogodiniyai 等<sup>[12]</sup>在研究中发现, 玉米秸秆附生微生物提高青贮中乳酸和乙酸含量可能与乳

球菌属和明串珠菌属丰度有关。McDonald 等<sup>[27]</sup>也曾报道, 在青贮中乳酸乳球菌和肠膜明串珠菌是乳酸菌属中丰度最高的菌种。甘蔗尾附生微生物处理中丙酸含量高于其他处理,  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量低于其他处理(除  $\text{S}\times\text{S}_1$  外)。大多数研究认为, 高含量的丙酸(>0.3% DM)可能是由于丙酸杆菌发酵引起的, 但在青贮中也发现了能够将葡萄糖和乳酸转化为丙酸和乙酸的丙酸杆菌, 这种细菌是否能在青贮中大量繁殖还不清楚<sup>[28]</sup>。本研究所有处理中丙酸含量均没有超过 0.3% DM, 而是否存在丙酸杆菌发酵还需进一步研究。甘蔗尾附生微生物处理( $\text{M}\times\text{S}_1$ 、 $\text{E}\times\text{S}_1$  和  $\text{S}\times\text{S}_1$ ) 中乙醇含量均高于其他处理。先前的研究报告, 青贮甘蔗中乙醇含量超过了 15% DM<sup>[29-30]</sup>。Driehuis 等<sup>[31]</sup>研究中也发现, 牧草青贮饲料中乙醇含量高达 5%~6% DM。这可能与大量附生酵母菌的存在有关, 酵母菌可以将糖类物质转化为乙醇。此外, 与其他处理相比, 以甘蔗尾为青贮原料的处理( $\text{S}\times\text{M}_1$ 、 $\text{S}\times\text{E}_1$  和  $\text{S}\times\text{S}_1$ ) 普遍有较高的乙酸和丙酸含量。Mogodiniyai 等<sup>[12]</sup>研究发现, 青贮原料特性影响青贮产物中乙酸和丙酸含量, 这或许解释了本试验中  $\text{S}\times\text{M}_1$ 、 $\text{S}\times\text{E}_1$  和  $\text{S}\times\text{S}_1$  处理较高乙酸和丙酸含量的原因。

#### 3.4 附生微生物对青贮原料暴露于空气后 pH、乳酸含量和酵母菌数量的影响

有氧变质是一个导致营养物质损失的过程, 酵母菌起到至关重要的作用。青贮饲料有氧稳定性一直以来都是国内外研究学者关注的热点和重点<sup>[6]</sup>。Ashbell 等<sup>[32]</sup>报道, 在有氧暴露过程中二氧化碳( $\text{CO}_2$ )的产量及 pH 可以作为青贮饲料有氧变质的可靠指标, 而且  $\text{CO}_2$  产量与 pH 变化的相关性系数为 0.99。Weinberg 等<sup>[21]</sup>进一步的研究表明, 在有氧暴露期间  $\text{CO}_2$  产生量低于 10 g/kg DM 和 pH 增加少于 0.5 个单位均认为青贮饲料是稳定的。本试验中, 有氧暴露 4 d 时,  $\text{M}\times\text{M}_1$  处理 pH 变化大于 0.5 单位, 乳酸含量急剧下降, 且酵母菌数量达到  $1\times 10^8$  CFU/g FM。E $\times\text{S}_1$  处理表现出最低的 pH (4.07), 而其酵母菌数量却在  $1\times 10^5$  CFU/g FM 左右。有研究报告, 毕赤酵母属和假丝酵母属能够耐受酸性环境, 这可能解释了低 pH 下酵母菌增多的原因<sup>[31]</sup>。此外,  $\text{M}\times\text{S}_1$  处理在有氧暴露 4 d 时 pH 小于初始值, 这可能是由于有氧暴露期间丙酸挥发或代谢, 使乳酸生产者在有

氧条件下将 WSC 转化为了乳酸<sup>[33]</sup>。以甘蔗尾原料为发酵底物的处理中 pH 均小于其他处理,这可能是由于甘蔗尾自身 BC 导致的原因。有氧暴露 8 d 时,除 E×M<sub>1</sub> 处理 pH 没有超过 0.5 个单位的变化,其余各处理 pH 变化均大于 0.5 个单位的变化,这说明玉米秸秆附生微生物可以提高象草青贮的有氧稳定性。

#### 4 结 论

本研究表明,玉米秸秆附生微生物可以显著提高试验中 3 种青贮原料的乳酸和乙酸含量;象草和甘蔗尾附生微生物可以显著降低玉米秸秆 DM 损失。有氧稳定性试验结果表明,玉米秸秆附生微生物可以提高青贮象草的有氧稳定性。

#### 参考文献:

- [ 1 ] CAO Y, CAI Y, TAKAHASHI T, et al. Effect of lactic acid bacteria inoculant and beet pulp addition on fermentation characteristics and *in vitro* ruminal digestion of vegetable residue silage[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94( 8 ): 3902-3912.
- [ 2 ] YANG J, CAO Y, CAI Y, et al. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93( 7 ): 3136-3145.
- [ 3 ] WARD R T, DE ONDARZA M B. Fermentation analysis of silage: use and interpretation[ J ]. Retrieved May, 2008, 29: 2015.
- [ 4 ] KASMAEI K M, RUSTAS B O, SPÖRNDLY R, et al. Prediction models of silage fermentation products on crop composition under strict anaerobic conditions: a meta-analysis[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96( 10 ): 6644-6649.
- [ 5 ] OLIVEIRA A S, WEINBERG Z G, OGUNADE I M, et al. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100( 6 ): 4587-4603.
- [ 6 ] 黄峰, 张露, 周波, 等. 青贮微生物及其对青贮饲料有氧稳定性影响的研究进展[ J ]. *动物营养学报*, 2019, 31( 1 ): 82-89.
- [ 7 ] MUCK R E. Silage microbiology and its control through additives[ J ]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2010, 39( Supl. 1 ): 183-191.
- [ 8 ] PAHLOW G, MUCK R E, DRIEHUIS F, et al. Microbiology of ensiling[ M ]//BUXTON D R, MUCK R E, HARRISON J H. *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, 2003, 42: 31-93.
- [ 9 ] DANIEL J L P, CHECOLLI M, ZWIELEHNER J, et al. The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage[ J ]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 205: 69-74.
- [ 10 ] 郭刚. 意大利黑麦草和象草不同刈割时间对青贮发酵品质的影响[ D ]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [ 11 ] MOGODINIYAI K K, PASSOTH V, SPÖRNDLY R, et al. A new sterilization and inoculation method in silage research[ J ]. *Grass and Forage Science*, 2015, 70( 4 ): 668-673.
- [ 12 ] MOGODINIYAI K K, DICKSVED J, SPÖRNDLY R, et al. Separating the effects of forage source and field microbiota on silage fermentation quality and aerobic stability[ J ]. *Grass and Forage Science*, 2017, 72( 2 ): 281-289.
- [ 13 ] MCDONALD P, HENDERSON A R. Determination of water-soluble carbohydrates in grass[ J ]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1964, 15( 6 ): 395-398.
- [ 14 ] AOAC. Official methods of analysis[ M ]. 15th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [ 15 ] LICITRA G, HERNANDEZ T M, VAN SOEST P J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds[ J ]. *Animal Feed Science and Technology*, 1996, 57( 4 ): 347-358.
- [ 16 ] PLAYNE M J, MCDONALD P. The buffering constituents of herbage and of silage[ J ]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1966, 17( 6 ): 264-268.
- [ 17 ] VAN SOEST P V, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74( 10 ): 3583-3597.
- [ 18 ] 和立文. 全株玉米青贮品质评价及其对肉牛育肥性能和牛肉品质的影响[ D ]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [ 19 ] BRODERICK G A. Alfalfa silage or hay versus corn silage as the sole forage for lactating dairy cows[ J ]. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68( 12 ): 3262-3271.

- [20] BARKER S B, SUMMERSON W H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1941, 138(2): 535-554.
- [21] WEINBERG Z G, CHEN Y, SOLOMON R. The quality of commercial wheat silages in Israel [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(2): 638-644.
- [22] 任海伟, 窦俊伟, 赵拓, 等. 添加剂对玉米秸秆和莠笋叶混贮品质的影响 [J]. *草业学报*, 2016, 25(10): 142-152.
- [23] 席兴军, 韩鲁佳, 原慎一郎, 等. 添加乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆青贮饲料品质的影响 [J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(2): 21-24.
- [24] COMINO L, TABACCO E, RIGHI F, et al. Effects of an inoculant containing a *Lactobacillus buchneri* that produces ferulate-esterase on fermentation products, aerobic stability, and fibre digestibility of maize silage harvested at different stages of maturity [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 198: 94-106.
- [25] MUCK R E, NADEAU E M G, MCALLISTER T A, et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 3980-4000.
- [26] 华金玲. 添加乳酸菌对整株水稻秸青贮发酵品质的影响 [D]. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- [27] MCDONALD P, HENDERSON A R, HERON S J E. The biochemistry of silage [M]. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.
- [28] KUNG L, Jr, SHAVER R D, GRANT R J, et al. Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4020-4033.
- [29] DANIEL J L P, WEIB K, CUSTÓDIO L, et al. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 185(1/2): 101-105.
- [30] KUNG L, JR., STANLEY R W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage [J]. *Journal of Animal Science*, 1982, 54(4): 689-696.
- [31] DRIEHUIS F, VAN WIKSELAAR P G. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(6): 711-718.
- [32] ASHBELL G, WEINBERG Z G, AZRIELI A, et al. A simple system to study the aerobic determination of silages [J]. *Canadian Agricultural Engineering*, 1991, 33(2): 391-393.
- [33] LEI C, YUAN X J, LI J F, et al. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and *in vitro* gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(7): 1592-1600.



## Effects of Epiphytic Microorganisms on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Silage

HUANG Feng LI Hao WANG Kun ZHOU Xiaokang GU Qichao ZHANG Lu  
ZHANG Jie YI Siyu ZOU Caixia\*

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** The effects of epiphytic microorganisms on silage fermentation quality and aerobic stability were studied in current experiment. Corn straw, elephant grass and sugarcane top were selected as the research objects, and obtain their epiphytic microorganisms by centrifuging the silage microbial suspension at high speed (15 000×g for 90 min). Fresh corn straw, elephant grass and sugar cane top were smashed, heated at 65 °C for 3 h and then heated at 105 °C for 15 h for sterilization. The 3 (sterilization raw materials)×3 (epiphytic microorganisms) experiment was used to design and reconstructed to a dry matter level of 40% before ensiling. The experiment was divided into 9 treatments with 3 replicates. All treatment samples were ensiled for 65 d. After silage, pH, conventional nutrient composition and volatile fatty acid content in each treatment were determined, and then subjected to an aerobic stability test for 8 days. The results showed as follows: 1) when using sterilized corn stalk as fermentation substrate, compared with the epiphytic microorganisms of corn stalk and elephant grass, the content of water-soluble carbohydrate (WSC) was significantly increased ( $P<0.01$ ), increased propionic acid content ( $P>0.05$ ), and the contents of lactic acid and acetic acid were significantly decreased by adding sugarcane top epiphytic microorganisms ( $P<0.01$ ). 2) When using sterilized elephant grass as fermentation substrate, compared with the epiphytic microorganisms of corn stalk and elephant grass, the contents of crude protein ( $P<0.01$ ) and WSC ( $P<0.05$ ) were significantly increased by adding sugarcane top epiphytic microorganisms. However, the addition of corn straw and sugarcane top epiphytic microorganisms significantly increased the content of lactic acid compared with the epiphyte microorganisms of elephant grass ( $P<0.05$ ). 3) When using sterilized sugarcane top as fermentation substrate, compared with elephant grass and sugarcane top epiphytic microorganisms, adding corn straw epiphytic microorganisms significantly increased lactic acid content ( $P<0.01$ ). 4) The epiphytic microorganisms of corn straw could improve the aerobic stability of elephant grass silage. In conclusion, the epiphytic microorganisms of corn straw can increase the contents of lactic acid and acetic acid in silage materials, and has a positive effect on the aerobic stability of the elephant grass silage. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12):5976-5984 ]

**Key words:** silage; epiphytic microorganism; fermentation quality; aerobic stability