

DOI: 10.11686/cyxb2024226

http://cyxb.magtech.com.cn

王思然, 刘蓓一, 田吉鹏, 等. 复合乳酸菌添加剂对低温环境下意大利黑麦草青贮发酵品质的影响. 草业学报, 2025, 34(5): 159—170.

WANG Si-ran, LIU Bei-yi, TIAN Ji-peng, et al. Improvement in the fermentation quality of Italian ryegrass silage by ensiling with combined lactic acid bacteria inoculants at low temperature. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 159—170.

复合乳酸菌添加剂对低温环境下意大利黑麦草青贮发酵品质的影响

王思然^{1,2}, 刘蓓一^{1,2}, 田吉鹏^{1,2}, 程云辉^{1,2}, 许能祥^{1,2}, 张文洁^{1,2}, 王欣^{1,2}, 丁成龙^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014; 2. 农业农村部种养殖结合重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:环境温度对青贮发酵品质具有重要影响。在寒冷地区,低温是限制青贮发酵的一个关键因素,然而目前关于提高低温环境下青贮发酵品质的研究较少。本试验旨在研究从青藏高原分离筛选出的4株乳酸菌(乳酸片球菌 LOG9、戊糖片球菌 LO7、棒状乳杆菌亚种 LM8、植物乳杆菌 M1)特性,并评价它们在3种环境温度(10、15、25℃)下对意大利黑麦草青贮发酵品质的组合添加效果。对筛选得到的菌株进行形态学和生理生化指标检测,随后在不同环境温度下(10、15、25℃)将其分别组合(LO7+LM8、LO7+M1、LOG9+LM8、LOG9+M1)添加至意大利黑麦草中(添加量: 1×10^5 cfu·g⁻¹鲜重),在实验室青贮罐(1 L)内发酵60 d后开启。4株菌株均可在5~20℃、pH 3.5~7.0、NaCl(3.0%、6.5%)条件下正常生长。青贮60 d后,与不同温度下对照组相比,各组合添加剂均可明显改善意大利黑麦草青贮发酵品质,显著提高乳酸含量和乳酸/乙酸($P < 0.05$),并显著降低pH、氨态氮含量和不良微生物数量($P < 0.05$)。在10和15℃环境温度下,与LO7+LM8/M1处理组相比,LOG9+LM8/M1处理组显著提高了乳酸含量和乳酸/乙酸($P < 0.05$),并显著降低了氨态氮含量($P < 0.05$)。相较于LOG9+M1处理组,LOG9+LM8处理组显著提高了乳酸含量和乳酸菌数量($P < 0.05$),并显著降低了氨态氮含量($P < 0.05$)。综合考虑,LOG9+LM8组最适宜作为提高低温环境下意大利黑麦草青贮发酵品质的复合乳酸菌添加剂。

关键词:发酵品质;复合乳酸菌添加剂;意大利黑麦草;青贮饲料;低温

Improvement in the fermentation quality of Italian ryegrass silage by ensiling with combined lactic acid bacteria inoculants at low temperature

WANG Si-ran^{1,2}, LIU Bei-yi^{1,2}, TIAN Ji-peng^{1,2}, CHENG Yun-hui^{1,2}, XU Neng-xiang^{1,2}, ZHANG Wen-jie^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, DING Cheng-long^{1,2*}

1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory for Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China

Abstract: Temperature is an important factor affecting ensilage. In cold regions, low temperature can be an adverse environmental condition for ensiling. However, few studies have focused on improving the ensiling process at low temperature to enhance silage quality. The aims of this study were: 1) To characterize the lactic acid bacteria (LAB) strains *Pediococcus acidilactici* LOG9, *Pediococcus pentosaceus* LO7, *Lentilactobacillus coryniformis* subsp. LM8, and *Lactiplantibacillus plantarum* M1, which were isolated from the Tibetan Plateau. 2) Determine

收稿日期:2024-06-11;改回日期:2024-09-12

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(32301500),江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2023]398),农业农村部种养殖结合重点实验室开放课题基金(202303)和江苏省大型科学仪器开放共享自主研究课题资助。

作者简介:王思然(1992—),男,新疆哈密人,助理研究员,博士。E-mail: wangsirana@jaas.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dingcl@jaas.ac.cn

the effect of adding combinations of these strains on the quality of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) silage produced at three temperatures (10, 15, 25 °C). The isolated strains were subjected to morphological, physiological, and biochemical analyses. Four combined inoculants (LO7+LM8, LO7+M1, LOG9+LM8, and LOG9+M1) were added to Italian ryegrass (at 1×10^5 cfu·g⁻¹ fresh weight). These mixtures were then ensiled for 60 days in laboratory silos (1 L) at different ambient temperatures (10, 15, 25 °C). All the isolates were able to grow normally at 5–20 °C, pH 3.5–7.0, with NaCl concentrations of 3.0% and 6.5% w/w. Compared with the three corresponding controls, all the combined LAB inoculants improved the quality of Italian ryegrass silage, as indicated by markedly higher ($P < 0.05$) lactic acid (LA) contents, higher lactic acid/acetic acid (LA/AA), lower pH and ammonia nitrogen (NH₃-N) contents, and lower counts of undesirable microorganisms. With ensilage at 10 and 15 °C, LOG9+LM8/M1 inoculants performed better than the LO7+LM8/M1 inoculants, as demonstrated by the distinctly higher ($P < 0.05$) LA contents and LA/AA, and lower NH₃-N contents. Compared with the silage produced with LOG9+M1, that produced with LOG9+LM8 had significantly ($P < 0.05$) higher LA contents and LAB counts, and lower NH₃-N contents. Therefore, the combined inoculant LOG9+LM8 is recommended as the starter culture for producing Italian ryegrass silage at low temperature.

Key words: fermentation quality; combined lactic acid bacteria inoculant; Italian ryegrass; silage; low temperature

青藏高原被誉为“世界第三极”，平均4000 m的海拔造就了它极寒缺氧的气候环境，而这种特殊的地理环境和气候条件也孕育出了一批具有独特功能的微生物^[1-2]。因此，开发和利用青藏高原地区的微生物种质资源是非常有必要的。然而，寒冷的气候环境也限制了西藏地区的饲草生产，导致当地家畜营养不良、生产性能下降，特别是在每年11月至次年4月的霜冻期^[3-4]。为此，有效贮存西藏地区的饲草资源对当地畜牧业的可持续发展至关重要。

青贮饲料是反刍动物重要的粗饲料来源，特别是在越冬期较长的地区。然而，青贮发酵过程受环境温度影响较大，一般20~37 °C的环境温度适宜青贮发酵^[5]。在实际生产中，低于20 °C的环境温度就会阻碍优质青贮饲料的生产，并且低温环境下制作的青贮饲料发酵品质较差，通常其pH值较高且产酸速率缓慢^[6-7]。研究发现，低温环境可通过抑制乳酸菌的生长速度和酶活性来降低青贮发酵效率^[8]。同时，商业乳酸菌添加剂的功能在低温环境下也会受到一定抑制^[9-10]。因此，急需分离筛选出一批能在低温环境下高效产酸的青贮用乳酸菌菌株，但目前关于耐低温乳酸菌提高低温环境下青贮饲料发酵品质的研究仍然较少。

追求发酵最优化是过去几十年来微生物学家们比较关注的一个研究领域。在青贮发酵方面，选择青贮添加剂的方式往往只是基于过去的经验和知识，缺乏一定科学依据，也没有考虑到发酵过程中各因子之间的相互作用(拮抗或协同)^[11]。更重要的是，青贮发酵过程中起主导作用的乳酸菌菌株在发酵前期和后期是不同的^[12]。因此，可以通过在青贮饲料中接种复合乳酸菌添加剂来实现青贮发酵最优化。此外，一项关于青贮添加剂的Meta分析研究^[13]显示，高达67%的青贮添加剂研究均与接种单一植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)有关，但很少有研究对复合乳酸菌添加剂的青贮效果进行评价。为此，还需进一步研究复合乳酸菌添加剂对青贮发酵品质的影响。

本试验旨在研究从青藏高原分离筛选出的4株乳酸菌[乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)LOG9、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)LO7、棒状乳杆菌亚种(*Lentilactobacillus coryniformis* supsb.)LM8、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)M1]特性，并评价它们在3种环境温度(10、15、25 °C)下对意大利黑麦草(*Lolium multiflorum*)青贮发酵品质的组合添加效果，为我国高寒地区优质青贮饲料的生产提供新思路。

1 材料与方法

1.1 乳酸菌菌株特性分析

根据Cai等^[14]的方法，2022年从日喀则草原站(位于中国西藏自治区日喀则市，北纬29°16′，东经88°51′，海

拔3836 m,年平均气温6.5℃,年平均降水量400 mm)自然发酵的玉米(*Zea mays*)秸秆和燕麦(*Avena sativa*)秸秆青贮饲料中共分离筛选出84株乳酸菌菌株。具体步骤如下:将20 g青贮饲料样品与180 mL无菌生理盐水混合,梯度稀释后在MRS(de Man, Rogosa, Sharpe)琼脂培养基(10 g蛋白胨、5 g牛肉粉、4 g酵母粉、2 g葡萄糖、1 mL吐温-80、2 g磷酸氢二钾、5 g乙酸钠、2 g柠檬酸三铵、0.2 g硫酸镁、0.05 g硫酸锰、15 g琼脂、1000 mL蒸馏水)上分离筛选乳酸菌。将MRS培养基上的细菌菌落数量控制在30~300个,随后对培养基中的菌落进行随机挑选和鉴定^[15]。将挑选出的每株乳酸菌在MRS琼脂培养基上纯化两次,每次纯化均在30℃厌氧条件下培养24 h,然后转移到含有10%甘油的MRS液体培养基(10 g蛋白胨、5 g牛肉粉、4 g酵母粉、2 g葡萄糖、1 mL吐温-80、2 g磷酸氢二钾、5 g乙酸钠、2 g柠檬酸三铵、0.2 g硫酸镁、0.05 g硫酸锰、1000 mL蒸馏水)中,-80℃下保存供后续分析。根据Cai等^[16]的方法对84株分离得到的乳酸菌菌株进行耐低温试验检测,最终筛选出表现较好的LOG9、LO7、LM8和M1这4株乳酸菌。菌株M1和LM8分别从青贮10和45 d的玉米秸秆青贮饲料中筛选出,菌株LO7和LOG9分别从青贮10和45 d的燕麦秸秆青贮饲料中筛选出。每株菌设5个生物学重复进行生理生化试验。根据杨晓丹等^[17]的乳酸菌鉴定方法,对这4株乳酸菌分别进行革兰氏染色、菌落形态观察、过氧化氢酶活性和葡萄糖产气试验。将这4株乳酸菌分别接种在不同pH的MRS液体培养基(用HCl或NaOH调节pH)中,37℃厌氧培养2 d后观察其生长情况。将这4株乳酸菌分别接种在不同温度(5、10、15和20℃)的MRS液体培养基中,厌氧培养5 d后观察其生长情况。将这4株乳酸菌分别接种在不同盐度(3.0%、6.5% NaCl)的MRS液体培养基中,37℃厌氧培养2 d后观察其生长情况。为评价乳酸菌产酸能力,每隔2 h用玻璃电极pH计(S400-K,瑞士苏黎世梅特勒-托莱多公司)分别测定这4株乳酸菌MRS液体培养基中的pH值。为评价乳酸菌生长速率,每隔2 h用可见分光光度计(7230G,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)在600 nm波长处分别测定这4株乳酸菌MRS液体培养基中的吸光度(optical density, OD)值。均根据伯杰氏系统细菌学手册(Bergey's manual of systematic bacteriology)^[18]测定乳酸菌在不同pH、温度和NaCl浓度下的生长情况、产酸速率和生长速率。乳酸菌的糖发酵试验采用API 50 CHL(法国生物梅里埃公司生产)试剂盒依据操作说明完成。使用“生长良好(++)”“生长正常(+)”“生长较差(W)”和“无法生长(-)”来描述乳酸菌在不同条件下的生长表现。用可见分光光度计(7230G,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)测定MRS液体培养基的OD值,并根据OD值评价乳酸菌生长情况。当乳酸菌的MRS液体培养基OD值大于1.5时,判定为生长良好;OD值为1.0~1.5,判定为“正常生长”;OD值为0.5~1.0,判定为“生长较差”,OD值小于0.5时为“无法生长”。

1.2 乳酸菌的DNA提取和菌种鉴定

采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术对乳酸菌16S rDNA编码区进行扩增,提取乳酸菌DNA后进行菌种鉴定^[19]。采用细菌DNA提取试剂盒(DP302,购自北京天根生化科技有限公司)按照操作说明提取乳酸菌菌株DNA。将乳酸菌菌株的16S rRNA序列上传至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI),并与其GenBank中16S rRNA序列进行比对,通过BLAST分析鉴定乳酸菌菌株^[20]。

1.3 青贮原材料

2023年4月15日在西藏日喀则草原站试验田中收获孕穗期意大利黑麦草,试验田土壤pH为8.1,总氮含量为0.54 g·kg⁻¹,钾含量为5.75 g·kg⁻¹,磷含量为0.46 g·kg⁻¹。意大利黑麦草种植期间无额外施肥,也无凋萎处理。收获后用手动切草机(93ZT-300,兴荣股份有限公司)将牧草切成2~3 cm长小段,并立即运往实验室,等待进一步处理。将牧草混匀后,取部分鲜样分析其化学和微生物成分。

1.4 试验设计

将筛选得到的4株乳酸菌分别接种在MRS液体培养基中,经30℃厌氧培养24 h后,用可见分光光度计(7230G,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)测定MRS液体培养基的OD值,确保乳酸菌接种剂满足1×10⁵ cfu·g⁻¹鲜重(fresh weight, FW)的规定接种剂量。研究发现,青贮前期多由乳球菌发挥主要作用,而青贮后期则由乳杆菌起主导作用^[16],因此本研究将这4株乳酸菌根据“乳球菌+乳杆菌”的模式进行了组合,最终形成4种复合乳酸菌添加剂(LO7+LM8、LO7+M1、LOG9+LM8、LOG9+M1),并按照1×10⁵ cfu·g⁻¹ FW的接种剂量添加

在切碎的新鲜意大利黑麦草中,对照组则添加等量去离子水。接种乳酸菌后,称取650 g左右充分混匀的意大利黑麦草,利用木棍将其压实填入1个容量为1 L的聚乙烯塑料瓶中,并用螺旋盖和塑料胶带进行封口,最后将密封好的青贮罐分别贮存在10、15和25 °C的温度培养箱中,青贮60 d后开启。每个处理设5个重复,共制备75个青贮罐(5种青贮添加剂处理×3种环境温度×5个重复=75)。

1.5 化学和微生物成分分析

取样时,将青贮罐内的全部青贮饲料样品倒入干净的塑料盆中充分混匀,随后从盆中选取3份子样品。称取第一份子样品(约100 g FW)用于测定干物质(dry matter, DM)含量,在65 °C烘箱中烘干48 h至恒重,随后用小型饲料粉碎机(SFSP999,中鼎饲料机械生产有限公司)粉碎,过1 mm筛网(FW100,泰斯特仪器有限公司)后用于测定样品化学成分。采用凯氏定氮法测定样品中总氮(total nitrogen, TN)含量^[21],将其乘以6.25即可计算出粗蛋白(crude protein, CP)含量。采用硫酸-蒽酮比色法测定样品中水溶性碳水化合物(water soluble carbohydrate, WSC)含量^[22]。

称取第二份子样品(约35 g FW)与70 g去离子水混合,置于4 °C冰箱24 h,随后经两层纱布和一层滤纸过滤后保留滤液,用于后续发酵品质分析。使用pH计(S400-K,瑞士苏黎世梅特勒-托莱多公司)测定样品pH值。采用氢氧化钠-盐酸滴定法^[23]测定新鲜意大利黑麦草的缓冲能(buffering capacity)。使用高效液相色谱法^[24]使用安捷伦1260型高效液相检测系统,配备示差检测器;流动相为2.5 mmol·L⁻¹稀硫酸溶液,流速0.5 mL·min⁻¹,柱温55 °C;色谱柱采用Carbomix H-NP柱(260508-7830,苏州赛分科技股份有限公司)测定样品中有机酸(乳酸、乙酸、丙酸、丁酸)含量。采用次氯酸-苯酚比色法^[25]测定样品中氨态氮(ammonia nitrogen, NH₃-N)含量。

称取第三份子样品(10.0 g FW),与90 mL无菌生理盐水(0.85% NaCl)在200 mL锥形瓶中混合,置于水平摇床振荡2 h(速度120 r·min⁻¹)。振荡结束后,从锥形瓶中吸取1 mL液体进行梯度稀释,用于乳酸菌、好氧菌、霉菌和酵母菌计数。乳酸菌采用MRS琼脂培养基在37 °C厌氧培养箱(N₂:H₂:CO₂=17:1:2, YQX-II)中培养3 d。好氧菌采用营养琼脂培养基(nutrient agar; 10 g蛋白胨、3 g牛肉膏、5 g氯化钠、15~20 g琼脂、1000 mL蒸馏水)培养,霉菌和酵母菌采用马铃薯(*Solanum tuberosum*)葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar; 200 g马铃薯、20 g葡萄糖、15~20 g琼脂、1000 mL蒸馏水)培养,好氧菌、霉菌和酵母菌均在37 °C生化培养箱(HPX-80,上海跃进医疗器械有限公司)中培养3 d。上述培养基均购自上海盛思生化科技有限公司。

1.6 数据处理与统计分析

试验采用完全随机设计,设有5种乳酸菌添加剂和3种不同环境温度,每个处理设5个重复,为5×3因子试验设计。采用一般线性模型(general linear model, GLM)对意大利黑麦草青贮饲料中化学成分和微生物数量进行双因素方差分析,使用SPSS(16.0)软件分析:

$$Y_{ij} = \mu + I_i + T_j + (I \times T)_{ij} + e_{ij}$$

式中: Y_{ij} 为因变量; μ 为总体均值; I_i 为乳酸菌添加剂处理($i=1, 2, 3, 4, 5$); T_j 为环境温度处理($j=1, 2, 3$); $(I \times T)_{ij}$ 为乳酸菌添加剂与环境温度的交互作用; e_{ij} 是残差项。采用Tukey多重比较法确定均值间的统计学差异($P < 0.05$)。

使用BLAST方法将4株乳酸菌菌株的16S rRNA序列与GenBank数据库中已知细菌的16S rRNA序列进行比对,寻找与目的基因序列同源性最高的已知分类地位的菌种,分析相似性。然后使用MEGA 6.0软件(生物设计研究所,亚利桑那州,美国)中的Clustal W功能对最近似类群的序列进行多重比较分析,并通过该软件的邻近法(neighbor joining)构建系统发育树,分支聚类的稳定性用Bootstrap方法进行2000次随机重复取样评价。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌菌株的特性

筛选得到的4株乳酸菌菌株(LOG9、LO7、M1、LM8)均呈革兰氏阳性、同型发酵和过氧化氢酶阴性的特点(表1)。菌株LOG9和LO7为球菌,菌株LM8和M1为杆菌。菌株LOG9和M1在pH为3.5~7.0均能正常生长,在pH为3.0条件下则生长较差。菌株LO7和LM8在pH为3.5~7.0均能正常生长。4株菌株在5~20 °C温

度和 3.0%、6.5% 盐度条件下均可正常生长。糖发酵结果显示, 菌株 LOG9 与 M1 具有相似的可利用碳源, 而菌株 LOG9 与 LM8 的可利用碳源差异较大。此外, 菌株 LOG9 的可利用碳源范围要明显比菌株 LO7 的更广(表 2)。

根据 16S rDNA 序列进行分子同源性分析并构建系统发育树, 观察 4 株乳酸菌的差异(表 3 和图 1)。菌株 LOG9、LM8 和 M1 分别与乳酸片球菌、棒状乳杆菌亚种和植物乳杆菌亲缘关系最密切, 与它们的 16S rDNA 基因序列相似度均为 99%, 系统发育树中也均显示 100% 近似度。菌株 LO7 与戊糖片球菌亲缘关系最密切, 与其 16S rDNA 基因序列相似度为 99%, 系统发育树中则显示 99% 近似度。本试验中, 4 株乳酸菌菌株的 16S rRNA 基因的核苷酸序列均上传至 GenBank 并获得相应登录号, 菌株 LOG9 登录号为 KJ779095, 菌株 LO7 登录号为 KJ779092, 菌株 LM8 登录号为 KJ779090, 菌株 M1 登录号为 KJ779098。菌株 LOG9 和 M1 生长速度及产酸速率均远大于菌株 LM8 和 LO7(图 2 和图 3)。

2.2 新鲜意大利黑麦草的化学成分及微生物数量

新鲜意大利黑麦草干物质含量为 247.0 g·kg⁻¹ FW, 粗蛋白含量为 67.1 g·kg⁻¹ DM, 水溶性碳水化合物含量为 106.5 g·kg⁻¹ DM, 缓冲能为 88.9 mEq·kg⁻¹ DM。新鲜意大利黑麦草表面附着乳酸菌、好氧菌、酵母菌和霉菌的数量分别为 4.37、6.43、4.61 和 4.03 log cfu·g⁻¹ FW(表 4)。

表 1 乳酸菌的生理生化特性

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria strains

项目 Items	LOG9	LO7	LM8	M1
形状 Shape	球菌 Cocci	球菌 Cocci	杆菌 Rod	杆菌 Rod
发酵类型 Fermentation type	同型 Homo	同型 Homo	同型 Homo	同型 Homo
革兰氏染色 Gram stain	+	+	+	+
过氧化氢酶活性 Catalase activity	-	-	-	-
葡萄糖产气试验 Gas from glucose	-	-	-	-
温度 Temperature (°C)				
5	+	+	+	+
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+
20	+	+	+	+
pH				
3.0	W	-	-	W
3.5	+	+	+	+
4.0	+	+	+	+
4.5	+	+	+	+
5.0	+	+	+	+
6.0	+	+	+	+
7.0	+	+	+	+
盐度 NaCl (%)				
3.0	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+

++: 生长良好 Good growth; +: 正常生长 Normal growth; W: 生长较差 Weak growth; -: 无法生长 No growth; Homo: 同型发酵 Homofermentative. 下同 The same below.

表 2 乳酸菌糖发酵试验

Table 2 The carbohydrate fermentation experiment of lactic acid bacteria strains

项目 Items	LOG9	LO7	LM8	M1	项目 Items	LOG9	LO7	LM8	M1
L-阿拉伯糖 L-arabinose	++	++	-	++	蜜二糖 Melibiose	++	++	++	++
核糖 Ribose	++	++	-	++	蔗糖 Saccharose	++	++	-	++
鼠李糖 Rhamnose	+	-	-	-	海藻糖 Trehalose	++	++	-	++
甘露醇 Mannitol	++	-	++	++	松三糖 Melezitose	++	-	-	++
山梨醇 Sorbitol	++	-	++	++	D-棉籽糖 D-raffinose	++	-	++	++
α-甲基-D-甘露糖苷 α-methyl-D-mannoside	++	-	-	++	β-龙胆二糖 β-gentiobiose	+	+	-	+
苦杏仁苷 Amygdaline	++	++	-	++	D-松二糖 D-turanose	++	-	-	++
七叶灵 Esculine	++	++	-	++	L-岩藻糖 L-fucose	-	-	+	-
纤维二糖 Cellobiose	++	++	-	++	D-阿拉伯糖醇 D-arabitol	W	-	-	W
乳糖 Lactose	++	++	-	++	葡萄糖酸盐 Gluconate	W	W	-	+

表3 乳酸菌菌株的16S rRNA基因测序结果

Table 3 16S rRNA gene sequencing results of lactic acid bacteria strains

菌株 Strain	登录号 Accession number	16S rRNA 基因测序数据(近源种) 16S rRNA gene sequencing data (closest relative)	相似度 Similarity (%)
LOG9	KJ779095	乳酸片球菌 DSM 20284 <i>P. acidilactici</i> DSM 20284	99
LO7	KJ779092	戊糖片球菌 DSM 20336 <i>P. pentosaceus</i> DSM 20336	99
LM8	KJ779090	棒状乳杆菌亚种 torquens 30 <i>L. coryniformis</i> subsp. torquens 30	99
M1	KJ779098	植物乳杆菌 JCM 1149 <i>L. plantarum</i> JCM 1149	99

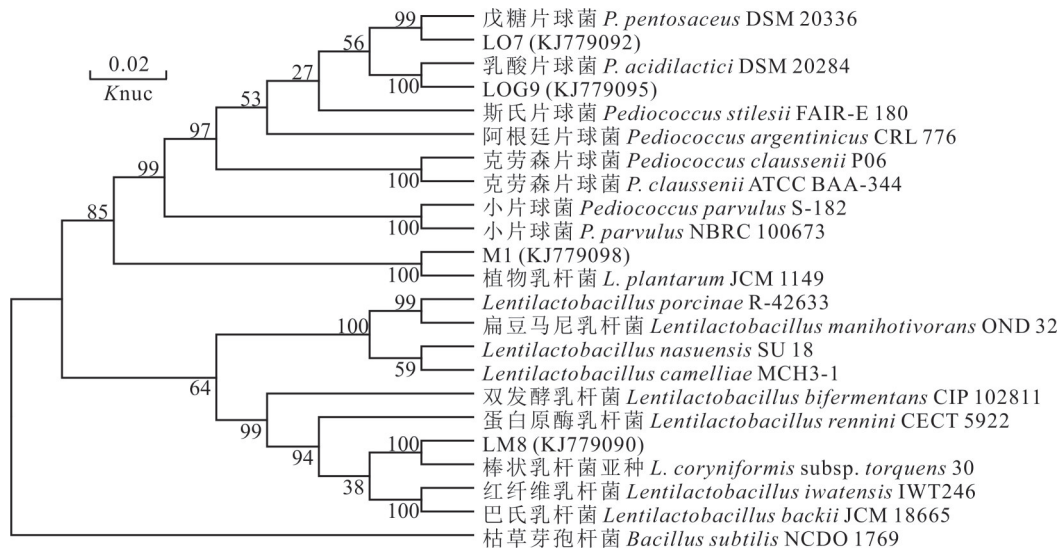


图1 基于16S rDNA序列比对的乳酸菌菌株LOG9、LO7、LM8和M1及相关菌种的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria strains LOG9, LO7, LM8 and M1 and related species based on 16S rDNA sequence alignment

Knuc: 核苷酸取代率 Nucleotide substitution rates. 以枯草芽孢杆菌为外族群。B. subtilis was used as the outgroup. LOG9: 乳酸片球菌 *P. acidilactici*; LO7: 戊糖片球菌 *P. pentosaceus*; LM8: 棒状乳杆菌亚种 *L. coryniformis* subsp.; M1: 植物乳杆菌 *L. plantarum*. 下同 The same below.

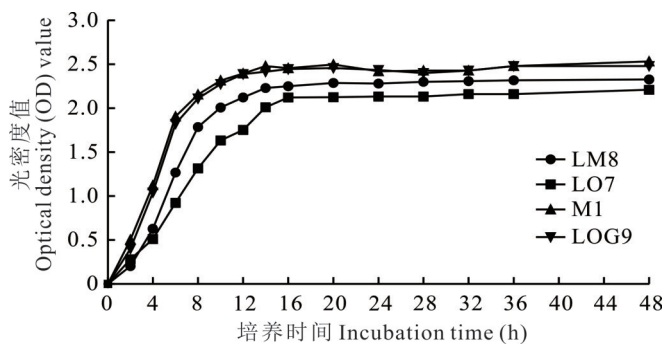


图2 4株乳酸菌菌株在MRS液体培养基培养过程中600 nm处的光密度值

Fig. 2 The optical density values at 600 nm of four lactic acid bacteria strains in de Man, Rogosa, Sharpe broth with the process of incubation

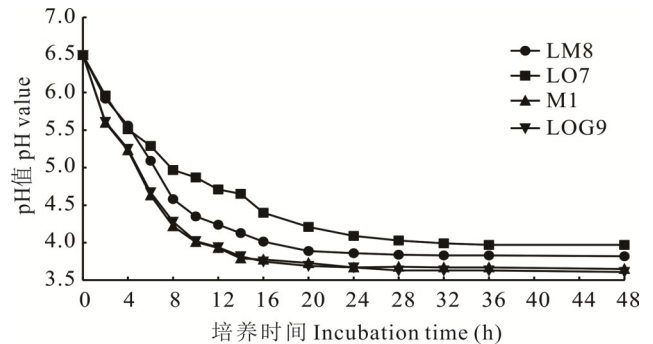


图3 4株乳酸菌菌株在MRS液体培养基培养过程中pH值的变化

Fig. 3 Changes of pH values of four lactic acid bacteria strains in de Man, Rogosa, Sharpe broth with the process of incubation

表 4 新鲜意大利黑麦草的化学成分及微生物数量

Table 4 Chemical compositions and microbial populations of Italian ryegrass prior to ensiling

项目 Items	指标 Index	意大利黑麦草 Italian ryegrass
化学成分	干物质 Dry matter ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FW)	247.0 \pm 3.13
Chemical compositions	粗蛋白 Crude protein ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DM)	67.1 \pm 1.34
	水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DM)	106.5 \pm 1.68
	缓冲能 Buffering capacity ($\text{mEq}\cdot\text{kg}^{-1}$ DM)	88.9 \pm 1.05
微生物数量	乳酸菌 Lactic acid bacteria	4.37 \pm 0.09
Microbial populations ($\log \text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	好氧菌 Aerobic bacteria	6.43 \pm 0.58
	酵母菌 Yeasts	4.61 \pm 0.13
	霉菌 Molds	4.03 \pm 0.12

FW: 鲜重 Fresh weight; DM: 干物质 Dry matter; mEq: mg 当量 Milligram equivalent; cfu: 菌落形成单位 Colony-forming units. 下同 The same below.

2.3 复合乳酸菌添加剂对不同环境温度下意大利黑麦草青贮发酵品质的影响

除干物质含量($P>0.05$)外,乳酸菌添加剂、环境温度及二者的交互作用均对意大利黑麦草青贮饲料中 pH 值、乳酸、乙酸、氨态氮、WSC 含量和乳酸/乙酸具有显著影响($P<0.05$, 表 5)。

与 3 种环境温度下的各对照组相比,乳酸菌添加剂均显著提高了乳酸、WSC 含量及乳酸/乙酸($P<0.05$),显著降低了 pH 和氨态氮含量($P<0.05$)。在各组中未检测到丙酸和丁酸含量。各组间的干物质含量无显著差异($P>0.05$)。

当环境温度为 10 °C 时,与 LO7+LM8/M1 组相比,LOG9+LM8/M1 组显著提高了乳酸含量和乳酸/乙酸($P<0.05$),显著降低了 pH 和氨态氮含量($P<0.05$)。与 LOG9+M1 组相比,LOG9+LM8 组中乳酸和 WSC 含量显著增加($P<0.05$),氨态氮含量显著降低($P<0.05$)。与 LO7+M1 组相比,LO7+LM8 组中乳酸含量显著降低($P<0.05$),氨态氮含量显著增加($P<0.05$)。当环境温度为 15 °C 时,相较于 LO7+LM8/M1 组,LOG9+LM8/M1 组中乳酸含量和乳酸/乙酸显著增加($P<0.05$),氨态氮含量显著降低($P<0.05$)。当环境温度为 25 °C 时,各接种组中 pH、乳酸、乙酸含量和乳酸/乙酸均无显著差异($P>0.05$)。

无论是否添加乳酸菌接种剂,随着环境温度的降低,各组中乳酸含量和乳酸/乙酸均显著下降($P<0.05$),pH 和氨态氮含量均显著升高($P<0.05$)。

2.4 复合乳酸菌添加剂对不同环境温度下意大利黑麦草青贮饲料中微生物数量的影响

环境温度、乳酸菌添加剂及二者的交互作用均对意大利黑麦草青贮饲料中乳酸菌、好氧菌、酵母菌和霉菌数量具有极显著影响($P<0.001$, 表 6)。与 3 种环境温度下各对照组相比,乳酸菌添加剂均显著提高了乳酸菌数量($P<0.05$),显著降低了好氧菌、酵母菌和霉菌数量($P<0.05$)。无论在何种环境温度下,LOG9+LM8 组中乳酸菌数量均显著高于其他处理组($P<0.05$)。当环境温度为 10 °C 时,LOG9+LM8/M1 组中好氧菌和霉菌数量均显著低于 LO7+LM8/M1 组($P<0.05$)。无论是否添加乳酸菌接种剂,随着环境温度的降低,各组中乳酸菌数量均显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 乳酸菌菌株的特性

菌株 LO7 和 LOG9 均能在 5 和 10 °C 环境温度下正常生长,这与 Cai 等^[16]从饲草中分离得到的戊糖片球菌和乳酸片球菌不同。菌株 M1 属于植物乳杆菌,对低 pH 和低温环境具有较高耐受性,这与 Pang 等^[26]的研究结果一致。Nakanishi 等^[27]发现,菌株 LM8 这类棒状乳杆菌可将甘油发酵生成具有一定抑菌功能的 3-羟基丙醛。经分离筛选得到的 4 株乳酸菌均能在 5 °C 环境温度下正常生长,表现出一定耐寒能力,这可能是由于它们长期在青藏高原的寒冷气候环境下生长和不断进化的自然选择结果。从遗传学角度分析,这 4 株乳酸菌可能过表达了某些冷应激基因^[28]。热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)具有防止乳酸菌受低温环境胁迫的作用。Song 等^[29]发

表5 复合乳酸菌添加剂对不同温度下意大利黑麦草青贮发酵品质的影响

Table 5 Effects of combined lactic acid bacteria inoculants on the silage quality of Italian ryegrass at different temperatures

项目 Items	pH	干物质 Dry matter (g·kg ⁻¹ FW)	乳酸 Lactic acid (LA, g·kg ⁻¹ DM)	乙酸 Acetic acid (AA, g·kg ⁻¹ DM)	乳酸/ 乙酸 LA/AA	氨态氮 NH ₃ -N (g·kg ⁻¹ TN)	水溶性碳水化 合物 WSC (g·kg ⁻¹ DM)
10 °C							
对照组 Control	5.87a	230a	42.0i	39.6a	1.06f	135.0a	8.2d
LO7+LM8	4.48c	228a	75.5g	25.1c	3.01e	88.1c	17.7b
LO7+M1	4.39c	228a	84.9f	16.3d	5.21e	74.1e	19.5b
LOG9+LM8	4.01de	230a	121.7c	8.4e	14.64abc	32.3h	30.5a
LOG9+M1	4.04de	228a	96.8e	8.2e	11.90cd	45.2g	16.3bc
15 °C							
对照组 Control	4.82b	230a	63.9h	34.5b	1.85ef	108.2b	10.5cd
LO7+LM8	3.93efg	233a	97.8e	10.4e	9.47d	75.5de	19.8b
LO7+M1	3.94ef	227a	101.1e	10.3e	9.90d	74.6e	18.4b
LOG9+LM8	3.74h	222a	131.8b	9.4e	14.10abc	41.8g	26.8b
LOG9+M1	3.83fgh	225a	113.7d	9.1e	12.60bc	54.1f	19.9b
25 °C							
对照组 Control	4.12d	225a	77.0g	27.0c	2.85ef	83.3cd	14.6cd
LO7+LM8	3.82gh	231a	140.4a	8.8e	15.97ab	72.7e	17.1b
LO7+M1	3.79h	223a	140.3a	8.5e	16.50a	42.3g	17.2b
LOG9+LM8	3.77h	223a	141.7a	8.9e	15.97ab	43.2g	17.3b
LOG9+M1	3.85fgh	224a	141.3a	8.4e	17.07a	42.5g	17.9b
SEM	0.08	0.80	4.62	1.55	0.87	4.19	0.83
不同环境温度下平均值 Mean values at different ambient temperatures							
10 °C	4.56a	229a	84.2c	19.5a	7.17c	74.9a	18.4ab
15 °C	4.05b	228a	101.6b	14.7b	9.58b	70.9b	19.1a
25 °C	3.87c	225a	128.1a	12.3c	13.67a	56.8c	16.8b
不同乳酸菌添加剂处理下平均值 Mean values under different lactic acid bacteria additive treatments							
对照组 Control	4.94a	228a	61.0e	33.7a	1.92c	108.8a	11.1c
LO7+LM8	4.08b	231a	104.5d	14.8b	9.48b	78.8b	18.2b
LO7+M1	4.04b	226a	108.7c	11.7c	10.54b	63.7c	18.4b
LOG9+LM8	3.84d	225a	131.7a	8.9c	14.90a	39.1e	24.9a
LOG9+M1	3.91c	226a	117.3b	8.6c	13.86a	47.3d	18.0b
显著性 Significance							
环境温度 Ambient temperature	<0.001	0.117	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.019
乳酸菌添加剂 LAB inoculants	<0.001	0.106	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
环境温度与乳酸菌添加剂的交互作用 Ambient temperature × LAB inoculants	<0.001	0.569	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

NH₃-N: 氨态氮 Ammonia nitrogen; TN: 总氮 Total nitrogen; WSC: 水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates; LAB: 乳酸菌 Lactic acid bacteria. SEM: 标准误 Standard error of mean. 同列不同小写字母表示不同乳酸菌添加剂或环境温度处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Different lowercase letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) among treatments with different lactic acid bacteria additives or ambient temperatures. The same below.

表 6 复合乳酸菌添加剂对不同温度下意大利黑麦草青贮饲料中微生物数量的影响

Table 6 Effects of combined lactic acid bacteria inoculants on the microbial populations of Italian ryegrass silage ($\log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

项目 Items	乳酸菌 LAB	好氧菌 Aerobic bacteria	酵母菌 Yeasts	霉菌 Molds
10 °C				
对照组 Control	5.42h	7.69a	4.78b	5.29a
LO7+LM8	8.66cd	5.27d	3.54de	3.51d
LO7+M1	8.55cde	5.22d	3.15ef	3.35d
LOG9+LM8	8.93b	3.53e	2.74fg	2.32e
LOG9+M1	8.70c	3.57e	2.71g	2.31e
15 °C				
对照组 Control	6.81g	7.17b	5.74a	5.60a
LO7+LM8	8.67cd	5.17d	4.54bc	4.27bc
LO7+M1	8.45de	5.15d	4.43bc	4.22c
LOG9+LM8	8.94b	5.14d	4.45bc	4.24c
LOG9+M1	8.61cd	5.10d	4.33c	4.12c
25 °C				
对照组 Control	7.18f	6.69c	5.83a	4.63b
LO7+LM8	8.36e	5.03d	3.55de	4.05c
LO7+M1	8.75bc	5.07d	3.62d	4.08c
LOG9+LM8	10.92a	5.06d	3.56de	4.07c
LOG9+M1	8.33e	5.08d	3.57d	4.08c
SEM	0.18	0.16	0.14	0.13
不同环境温度下平均值 Mean values at different ambient temperatures				
10 °C	8.05c	5.06c	3.39c	3.35c
15 °C	8.30b	5.55a	4.70a	4.49a
25 °C	8.71a	5.39b	4.03b	4.18b
不同乳酸菌添加剂处理下平均值 Mean values under different lactic acid bacteria additive treatments				
对照组 Control	6.47c	7.18a	5.45a	5.17a
LO7+LM8	8.56b	5.15b	3.88b	3.94b
LO7+M1	8.58b	5.15b	3.73bc	3.88b
LOG9+LM8	9.60a	4.58c	3.58cd	3.54c
LOG9+M1	8.55b	4.59c	3.54d	3.50c
显著性 Significance				
环境温度 Ambient temperature	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
乳酸菌添加剂 LAB inoculants	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
环境温度与乳酸菌添加剂的交互作用 Ambient temperature × LAB	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

现, 过表达 *Hsp 18.5*、*Hsp 18.55* 和 *Hsp 19.3* 的植物乳杆菌菌株在低温环境下能生长得更好。上述 4 株乳酸菌的耐低温特性也为其在实际生产中的应用提供了巨大潜力。

仅根据微生物的表型数据是难以区分微生物菌种的, 但可以运用微生物 16S rDNA 序列分析方法, 在属和种水平上成功识别出微生物菌种^[20]。通过分子同源性分析和 16S rDNA 的测序结果, 构建系统发育树, 并观察微生物的种类差异。结果发现, 菌株 LOG9、LO7、LM8 和 M1 可分别鉴定为乳酸片球菌、戊糖片球菌、棒状乳杆菌亚种和植物乳杆菌。

3.2 复合乳酸菌添加剂对意大利黑麦草青贮发酵品质的影响

自然青贮过程中, 牧草表面附着的乳酸菌数量已成为预测青贮发酵是否充分以及青贮前是否需要接种乳酸菌添加剂的重要考虑因素^[30]。本试验中, 意大利黑麦草表面附着的乳酸菌数量 ($10^4 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) 低于 Wang 等^[31]报道的青贮时牧草表面附着乳酸菌的最低数量要求 ($10^5 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。此外, 环境温度对青贮发酵过程影响较

大^[5]。本试验中,青贮发酵品质较差的各组均是不同环境温度下的对照组,特别是在10和15℃温度下。在低温条件下,较低的青贮发酵效率可能与低温环境抑制了细菌的代谢活动有关。Aguilar等^[32]发现,在不利的生长环境下,微生物细胞膜的质子渗透率会下降。Song等^[29]指出,对多数细菌来说,温度的降低会导致短暂的细胞生长停滞,严重抑制细菌中多数蛋白质的合成,并且还会影响到细菌的生存能力和酸化活性。因此,提高乳酸菌的数量和活性对改善低温环境下青贮饲料的发酵品质至关重要。

在青贮饲料中接种乳酸菌添加剂是一种广泛使用的青贮调制加工方法。大多商业乳酸菌添加剂中均含有片球菌属乳酸菌和植物乳杆菌,片球菌属乳酸菌在pH 5.0~6.5的环境中仍具有一定活性,且能在青贮发酵早期占据主导地位,进而加速青贮过程中pH的下降,同时也为适应较低pH环境的植物乳杆菌提供了良好的生长环境。与乳球菌相比,植物乳杆菌更有利于进行长期的乳酸发酵^[33]。本试验中,不同环境温度下各处理组的青贮发酵品质均优于相应对照组,这表明即使在低温环境下,这些复合乳酸菌添加剂也能有效提高意大利黑麦草的青贮发酵品质。但需注意的是,这些复合乳酸菌添加剂在低温环境下对意大利黑麦草青贮发酵品质的改善效果并不相同。

在10和15℃的环境温度下,LOG9+LM8/M1组对意大利黑麦草青贮发酵品质的改善效果要优于LO7+LM8/M1组,它们之间的主要差别是球菌菌株LOG9和LO7。因此,针对这种现象有以下两种推测进行解释,一种原因可能是菌株LOG9的生长速度和产酸速率明显快于LO7(图2和图3)。McDonald等^[33]研究发现,若乳酸菌的生长速度更快、能适应环境pH的范围更广,则可以有效提高乳酸菌的竞争力。因此,菌株LOG9和LO7在青贮过程中表现出的竞争力不同。第二种原因可能是菌株LOG9比LO7具有更广泛的碳源(表2)。乳酸菌利用饲草中不同发酵底物的能力在与其他微生物竞争时会成为一种优势,特别是在WSC含量有限的情况下^[34]。有趣的是,本研究仅在低温环境下发现了这种现象,这可能是由于在不利的生长环境下,微生物之间对发酵底物的竞争更加激烈。

令人意外的是,在低温环境下,LOG9+LM8组中乳酸菌数量和WSC含量显著高于其他各组,这可能是由于菌株LOG9和LM8的碳源来源不一致且生长速率不同所致。达尔文在其自然选择理论^[35]中指出,当种群与环境资源的比例达到一定值时,具有相似需求和习惯的生物之间会发生种间竞争。因此,菌株LOG9与LM8在这种条件下具有良好的兼容性,且该组合模式在低温环境下发酵效率最高,参考LOG9+LM8的乳酸菌组合模式将有助于实现恶劣环境下的青贮发酵最优化。

本试验中,各组干物质含量整体比新鲜意大利黑麦草有所下降,这可能是由于在青贮过程中,微生物将牧草中易利用的WSC转化为有机酸、乙醇和二氧化碳。此外,各处理组中乳酸含量较高、乙酸含量较低,表明各处理组具有较强的同型发酵模式,这可能是由于添加的乳酸菌菌株均具有较强的耐酸性和同型发酵特性(表1)。各处理组的乳酸/乙酸均高于相应对照组,这也证明了各处理组中同型乳酸发酵较强。

氨态氮含量可反映青贮饲料中蛋白质的降解情况,也是评价青贮发酵品质的重要指标。本试验中,与相应对照组相比,各处理组中氨态氮含量均显著下降,这可能是由于乳酸菌添加剂促进青贮过程中pH值迅速下降,从而抑制了梭状芽孢杆菌等不良微生物的生长和蛋白水解活性^[36]。与对照组相比,各处理组中WSC含量均显著较高,这可能是由于乳酸菌添加剂促使青贮早期发生了快速而强烈的乳酸发酵,导致青贮前期pH迅速下降,从而减少了WSC被好氧菌等不良微生物的利用。各处理组均显著降低了好氧菌、酵母菌和霉菌的数量,这与Wang等^[37]的研究结果一致,他们研究发现同型发酵乳酸菌产生的乳酸和其他挥发性脂肪酸可有效抑制有害微生物的生长繁殖。

挑选理想的青贮用乳酸菌添加剂通常要考虑若干选择标准,最常见的选择标准有乳酸菌快速生长、与其他微生物相竞争的能力等。其次,还要求乳酸菌通过同型发酵方式产生大量乳酸,并具备一定耐酸能力。本试验结果表明,复合乳酸菌添加剂对青贮发酵品质的改善效果并不一致,特别是在低温环境下,这可能与乳酸菌菌株的生理生化特性密切相关。因此,为实现青贮发酵最优化,在选择合适的复合乳酸菌添加剂时需考虑乳酸菌菌株之间的兼容性。

4 结论

在低温环境下意大利黑麦草难以青贮成功,各复合乳酸菌添加剂均能在不同环境温度(10、15和25℃)下有效提高意大利黑麦草青贮发酵品质,其中LOG9+LM8组在低温环境下表现最佳。因此,LOG9+LM8组被推荐作为提高低温环境下意大利黑麦草青贮发酵品质的复合乳酸菌添加剂。

参考文献 References:

- [1] Cui Z M, Guo G, Yuan X J, *et al.* Characterization and identification of high quality lactic acid bacteria from hullless barley straw silage. *Acta Agrestia Sinica*, 2015, 23(3): 607–615.
崔焯茗, 郭刚, 原现军, 等. 青稞秸秆青贮饲料中优良乳酸菌的筛选及鉴定. *草地学报*, 2015, 23(3): 607–615.
- [2] Pang H L, Tan Z, Qin G, *et al.* Phenotypic and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from forage crops and grasses in the Tibetan Plateau. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(1): 63–71.
- [3] Zhang J, Guo G, Chen L, *et al.* Effect of applying lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of oats-common vetch mixed silage on the Tibetan Plateau. *Animal Science Journal*, 2015, 86(6): 595–602.
- [4] Lin D D, Ju Z L, Chai J K, *et al.* Screening and identification of low temperature tolerant lactic acid bacterial epiphytes from oats on the Qinghai–Tibetan Plateau. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(5): 103–114.
蔺豆豆, 琚泽亮, 柴继宽, 等. 青藏高原燕麦附着耐低温乳酸菌的筛选与鉴定. *草业学报*, 2022, 31(5): 103–114.
- [5] Weinberg Z G, Szakacs G, Ashbell G Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(4): 561–566.
- [6] Ali M, Cone J W, Khan N A, *et al.* Effect of temperature and duration of ensiling on *in vitro* degradation of maize silages in rumen fluid. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99(2): 251–257.
- [7] Kung L. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. (2010-12-01)[2024-06-10]. <https://alfalfasyposium.ucdavis.edu/+symposium/proceedings/2010/10-41.pdf>.
- [8] Zhou Y, Drouin P, Lafrenière C. Effect of temperature (5–25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 657–671.
- [9] Kim K H, Uchida S. Comparative studies of ensiling characteristics between temperate and tropical species. 1. The effects of various ensiling conditions on the silage quality of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.). *Japanese Journal of Grassland Science*, 1990, 36(3): 292–299.
- [10] Weinberg Z G, Muck R E. New trends in development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19(1): 53–68.
- [11] Ziełńska K J, Fabiszewska A U. Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(1): 9.
- [12] Parvin S, Nishino N. Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodegrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis. *Grassland Science*, 2010, 56(1): 51–55.
- [13] 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. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(6): 4587–4603.
- [14] 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.
- [15] Avila C L S, Carvalho B F, Pinto J C, *et al.* The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(2): 940–951.
- [16] Cai Y M, Kumai S, Ogawa M, *et al.* Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 2901–2906.
- [17] Yang X D, Yuan X J, Guo G, *et al.* Isolation and identification of low temperature-tolerant lactic bacteria from legume silages in Tibet. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(6): 99–107.
杨晓丹, 原现军, 郭刚, 等. 西藏豆科牧草青贮饲料中耐低温优良乳酸菌的筛选. *草业学报*, 2015, 24(6): 99–107.
- [18] Boone D R, Garrity G M, Castenholz R W, *et al.* *Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes*. New York: Springer, 2001.
- [19] Zhang Q, Yu Z, Wang X. Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains with or without sucrose for effectiveness of silage

- fermentation. *Grassland Science*, 2015, 61(3): 167–176.
- [20] Zhang H J, Yu Z, Wang L, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from silage and filtering of excellent strains. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(1): 137–141.
张慧杰, 玉柱, 王林, 等. 青贮饲料中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选. *草地学报*, 2011, 19(1): 137–141.
- [21] Zhang J M, Guan H, Li H P, *et al.* Effects of oat: feed pea sowing ratio and lactic acid bacteria addition on crop silage fermentation and ruminal degradation characteristics of the resulting total mixed ration. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(1): 169–181.
张珈敏, 关皓, 李海萍, 等. 混播比例及乳酸菌剂对燕麦—饲用豌豆发酵 TMR 品质及瘤胃降解特性的影响. *草业学报*, 2024, 33(1): 169–181.
- [22] Owens V, Albrecht K, Muck R, *et al.* Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Science*, 1999, 39(6): 1873–1880.
- [23] Jasaitis D K, Wohlt J E, Evans J L. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70(7): 1391–1403.
- [24] Tian J P, Liu B Y, Gu H R, *et al.* Effects of lactic acid bacteria and calcium propionate on fermentation quality and mycotoxin contents of whole plant maize and oat silages. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(8): 157–166.
田吉鹏, 刘蓓一, 顾洪如, 等. 乳酸菌及丙酸钙对全株玉米和燕麦青贮饲料发酵品质和霉菌毒素含量的影响. *草业学报*, 2022, 31(8): 157–166.
- [25] 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.
- [26] Pang H L, Qing Y, Tan Z F, *et al.* Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and *recA* gene analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(3): 235–241.
- [27] Nakanishi K, Tokuda H, Ando T, *et al.* Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin: Screening of LAB to produce reuterin. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 2002, 13(1): 37–45.
- [28] Derzelle S, Hallet B, Francis K P, *et al.* Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(18): 5105–5113.
- [29] Song S, Bae D W, Lim K, *et al.* Cold stress improves the ability of *Lactobacillus plantarum* 167 to survive freezing. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 191(17): 135–143.
- [30] Huang L J, Sun R J, Gao W J, *et al.* Screening and identification of whole rice surface dominant lactic acid bacteria. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(1): 117–125.
黄丽娟, 孙榕基, 高文婧, 等. 全株水稻表面优势乳酸菌的筛选与鉴定. *草业学报*, 2024, 33(1): 117–125.
- [31] Wang S R, Li J F, Dong Z H, *et al.* Effect of microbial inoculants on the fermentation characteristics, nutritive value, and *in vitro* digestibility of various forages. *Animal Science Journal*, 2019, 90(2): 178–188.
- [32] Aguilar A, Ingemansson T, Magnien E. Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 367–373.
- [33] McDonald P, Henderson A R, Heron S J E. *The biochemistry of silage*. London: Chalcombe Publications, 1991.
- [34] Saarisalo E, Skyttä E, Haikara A, *et al.* Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(2): 327–336.
- [35] Darwin C. On the origin of species by means of natural selection. *American Anthropologist*, 1963, 61(1): 176–177.
- [36] Wang S R, Shao T, Li J F, *et al.* Fermentative products and bacterial community structure of C₄ forage silage in response to epiphytic microbiota from C₃ forages. *Animal Bioscience*, 2022, 35(12): 1860–1870.
- [37] Wang S R, Dong Z H, Li J F, *et al.* *Pediococcus acidilactici* strains as silage inoculants for improving the fermentation quality, nutritive value and *in vitro* ruminal digestibility in different forages. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(2): 424–434.