

DOI: 10.11686/cyxb2024241

http://cyxb.magtech.com.cn

陈鑫珠, 林平冬, 岳稳, 等. 不同添加剂对蚕豆秸秆青贮品质及微生物多样性的影响. 草业学报, 2025, 34(4): 164-174.

CHEN Xin-zhu, LIN Ping-dong, YUE Wen, *et al.* Effects of various additives on the quality and microbial diversity of broad bean straw silage. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 164-174.

不同添加剂对蚕豆秸秆青贮品质及微生物多样性的影响

陈鑫珠^{1**}, 林平冬^{1**}, 岳稳¹, 杨雅妮^{1,2}, 邱水玲^{1,2}, 郑向丽³

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建省畜禽遗传育种重点实验室, 福建福州 350013; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福建福州 350001; 3. 福建省农业科学院资源环境与土壤肥料研究所, 福建福州 350013)

摘要:为研究不同添加剂对蚕豆秸秆青贮品质和微生物多样性的影响, 设3%蔗糖(T₁组)、乳酸菌(T₂组)、乳酸菌+3%蔗糖(T₃组)、乳酸菌+0.2%柠檬酸(T₄组)、0.2%柠檬酸(T₅组)、0.03% NaCl(T₆组)、0.1%维生素C(T₇组)7个添加剂处理组和无添加剂对照组(CK组), 每个处理3个重复。青贮30 d后开封取样, 进行青贮料的感官质量、青贮品质及微生物多样性分析。结果表明, 1)在感官质量上, 7个添加剂处理组均为1级, 优于CK组; 2)在青贮品质上, 与对照组相比, T₁组的乙酸(AA)含量显著提高($P < 0.05$); T₂组乳酸(LA)含量显著提高, pH值显著降低($P < 0.05$); T₃组可溶性碳水化合物(WSC)、LA和AA含量显著提高($P < 0.05$), 酸性洗涤纤维含量和pH值显著降低($P < 0.05$); T₄组WSC和LA含量显著提高($P < 0.05$), pH值和氨态氮含量显著降低($P < 0.05$); T₅和T₇组的LA和AA含量均显著提高($P < 0.05$), 粗蛋白(CP)含量显著降低($P < 0.05$); T₆组WSC、LA和AA含量显著提高($P < 0.05$), CP含量显著降低($P < 0.05$); 3)在微生物多样性上, 各组在属水平上的优势菌群均为肠杆菌属(占比19.3%~41.3%)和乳植杆菌属(占比12.0%~40.0%); 与对照组相比, T₃、T₅、T₇组的乳植杆菌属、片球菌属和魏斯氏菌属相对丰度显著提高($P < 0.05$), 其中T₃组的Alpha多样性和Beta多样性差异显著($P < 0.05$)。由此可见, 添加剂处理能够改善蚕豆秸秆青贮料的感官和青贮品质, 调整青贮发酵微生物群落结构, 其中乳酸菌联合3%蔗糖处理的青贮发酵效果最佳。

关键词:蚕豆秸秆; 添加剂; 青贮品质; 微生物多样性

Effects of various additives on the quality and microbial diversity of broad bean straw silage

CHEN Xin-zhu^{1**}, LIN Ping-dong^{1**}, YUE Wen¹, YANG Ya-ni^{1,2}, QIU Shui-ling^{1,2}, ZHENG Xiang-li³

1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350001, China; 3. Institute of Resources, Environment and Soil Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China

Abstract: This study investigated the effects of different additives on the quality and microbial diversity of broad bean straw silage. The experiment included seven additive treatments (T₁ with 3% sucrose, T₂ with lactic acid bacteria,

收稿日期: 2024-04-30; 改回日期: 2024-07-29

基金项目: 国家自然科学基金(32302791), 福建省人民政府中国农业科学院农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021012, XTCXGC2021019)和非粮蛋白饲料资源开发关键技术研究及产业化应用(福建省生猪营养与饲养重点实验室)(2022L3056)资助。

作者简介: 陈鑫珠(1985-), 女, 福建龙岩人, 副研究员, 博士。E-mail: 010622051@163.com。林平冬(1990-), 女, 福建莆田人, 助理研究员, 博士。E-mail: lpd7911@163.com。 ** 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

T₃ with lactic acid bacteria + 3% sucrose, T₄ with lactic acid bacteria + 0.2% citric acid, T₅ with 0.2% citric acid, T₆ with 0.03% NaCl, and T₇ with 0.1% vitamin C) and a control group without additives (CK group), with 3 replicates for each treatment. After 30 days of ensiling, samples of the silages were analysed of sensory quality, ensiling quality, and microbial diversity. It was found that: 1) In terms of sensory quality, all the seven additive treatment groups were grade 1, and were superior to the CK group. 2) In terms of ensiling quality, compared with the control group, acetic acid (AA) content in the T₁ group was significantly increased ($P < 0.05$); Lactic acid (LA) content in the T₂ group was significantly increased ($P < 0.05$), and pH value was significantly decreased ($P < 0.05$). The contents of water soluble carbohydrates (WSC), LA and AA in the T₃ group were significantly increased ($P < 0.05$), and the content of acid detergent fiber and pH value were significantly decreased ($P < 0.05$). The WSC and LA contents in the T₄ group were significantly increased ($P < 0.05$), while the pH value and ammoniacal nitrogen content were significantly decreased ($P < 0.05$); The contents of LA and AA in T₅ and T₇ groups were significantly increased ($P < 0.05$), while the crude protein (CP) content was significantly decreased ($P < 0.05$); The contents of WSC, LA and AA in the T₆ group were significantly increased ($P < 0.05$), while CP content was significantly decreased ($P < 0.05$). 3) In terms of microbial diversity, the dominant bacterial groups at the genus level in each group were *Enterobacter* (accounting for 19.3%–41.3%) and *Lactiplantibacillus* (accounting for 12.0%–40.0%). Compared with the control group, the relative abundance of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Weissella* in the T₃, T₅, and T₇ groups was significantly increased ($P < 0.05$), and the Alpha diversity and Beta diversity in the T₃ group were significantly different ($P < 0.05$). In summary, the additive treatment enhanced the sensory and silage quality of broad bean straw silage and regulated the microbial community structure of silage fermentation. Among the treatments, combining lactic acid bacteria with 3% sucrose had the best fermentation effect.

Key words: broad bean straw; additives; silage quality; microbial diversity

蚕豆 (*Vicia faba*), 又名佛豆或胡豆, 为常见的豆科作物, 在我国南北地区均有栽植。作为一种粮、菜、饲、绿肥兼用作物, 蚕豆植株具有生物固氮作用, 其成熟种子可鲜食或制作蚕豆类制品, 摘蚕豆籽粒后剩余的蚕豆秸秆常废弃在田间地头或作为绿肥还田。蚕豆秸秆富含蛋白质、氨基酸、微量元素等营养物质, 和玉米 (*Zea mays*) 等农作物秸秆相比, 具有更高的营养价值, 可作为草食动物的优质蛋白饲草原料进行开发利用^[1]。这不仅可以解决我国南方豆科牧草缺乏的问题, 也能减少精料中豆粕的用量, 对豆粕减量替代行动也有重要意义。但蚕豆秸秆富含纤维素和木质素等粗纤维, 鲜喂不利于动物消化吸收; 且蚕豆收获的季节在4–6月, 正是南方的梅雨季节, 不利干草的制作和保存; 另外, 蚕豆秸秆切割暴露在空气中, 短时间内就开始发生褐变, 草料发黑变黏, 不仅影响品相, 而且营养成分也发生改变。因此, 探寻蚕豆秸秆适宜的保存技术, 对其作为饲草料资源的开发利用具有重要意义。

青贮是一种最经济和实用的饲草保存方式, 它密封隔绝氧气, 可最大程度防止褐变, 最大限度保持青绿饲草的营养物质和酸香气味, 提高适口性和饲喂价值^[2]。但蚕豆秸秆的水分、粗蛋白含量和缓冲能均较高, 常规青贮无法将其有效保存, 故使用添加剂进行处理, 以调控发酵过程, 改善青贮品质。目前常用的青贮添加剂包括乳酸菌、酶制剂、糖蜜、食盐、有机酸和无机酸盐等^[3]。多数研究表明, 添加乳酸菌、酶制剂可以提高青贮牧草的乳酸和乙酸含量, 降低pH值和丁酸含量, 抑制有害菌生长, 减少青贮腐败变质, 并能改善青贮微生物群落结构, 增加微生物多样性, 促进青贮发酵, 提升青贮品质^[4–8]。薛祝林等^[9]和郭海明等^[10]研究发现, 糖蜜、食盐等营养性添加剂除了可以调整青贮饲料适口性以外, 也具有改善青贮发酵品质和提升有氧稳定性的作用。有机酸及相关盐类属于防腐剂型添加剂, 具有良好的防霉防褐变作用^[11]。如柠檬酸的酸化和抗氧化特性不仅可以抑制褐变, 还能改善青贮营养品质和发酵特性^[12]。将这类添加剂应用于蚕豆秸秆青贮, 有利于抑制鲜绿秸秆褐变, 提高其利用价值。

蚕豆秸秆青贮是其资源化利用的主要方式之一,添加剂处理可调制优质的青贮饲料,但如何合理有效地使用添加剂使其发挥最佳作用效果仍需更多探索。本试验以蚕豆秸秆为原料,探究添加蔗糖、乳酸菌、柠檬酸、食盐(NaCl)和维生素C(vitamin C, VC)对蚕豆秸秆青贮感官质量、营养成分、发酵品质及微生物多样性的影响,以筛选效果优良的青贮添加剂,为蚕豆秸秆青贮饲料的调制和应用提供理论和技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验所用鲜绿蚕豆秸秆于2023年4月22日收取自福建省连江县官坂镇浮泉村农场。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物营养研究中心从花生(*Arachis hypogaea*)秸秆青贮料中分离所得,经中国工业微生物菌种保存中心鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),命名为*Lactobacillus plantarum* Hua 37 L1。将该菌株接种于MRS肉汤培养基(蛋白胨10.0 g、牛肉膏10.0 g、酵母提取物5.0 g、葡萄糖20.0 g、吐温1.0 mL、硫酸镁0.1 g、柠檬酸铵2.0 g、乙酸钠5.0 g、硫酸锰0.05 g、磷酸氢二钾2.0 g),添加时为接种18 h的新鲜菌液,划板活菌数为 10^{10} cfu·mL⁻¹以上。

1.2 试验设计

试验设8个处理,分别为无添加(蒸馏水处理)对照组(CK组)、3%蔗糖(T₁组)、乳酸菌(T₂组)、乳酸菌+3%蔗糖(T₃组)、乳酸菌+0.2%柠檬酸(T₄组)、0.2%柠檬酸(T₅组)、0.03% NaCl(T₆组)和0.1% VC(T₇组),每个处理3个重复,添加剂的添加量以秸秆鲜重计算。

1.3 青贮料调制

用380 V电动铡草机(上海卡曼实业)将蚕豆秸秆切成2~3 cm的小段,混合均匀后,称取8份1.5 kg秸秆,使用小型喷雾器将蒸馏水和各添加剂按秸秆鲜重计算用量均匀喷洒至每份原料中,充分混匀后称重装入聚乙烯青贮袋(30 cm×20 cm),每袋0.5 kg,每组3个重复,抽真空密封后,置于室温下贮存发酵30 d后开袋取样(一式3份)分析。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 感官质量评定 参照德国农业协会(deutsche landwirtschafts-gesellschaft, DLG)青贮质量感官评分等级方法^[13],从气味、结构、色泽3个方面对蚕豆秸秆青贮感官质量进行评定,满分为20分。得分16~20分为1级(优良);10~15分为2级(尚好);5~9分为3级(中等);0~4分为4级(腐败)。

1.4.2 常规营养成分含量测定 青贮料开袋后将样品混匀,从每袋取150 g样品放入105 °C烘箱中杀青30 min,再65 °C烘干48 h至恒重,测定干物质(dry matter, DM)含量。将干燥样品用粉碎机粉碎并过孔径0.425 mm筛,所得样品粉末于阴凉干燥处保存待测。参照GB/T 6432-2018测定粗蛋白(crude protein, CP)含量;分别参照GB/T 20806-2022和NY/T 1459-2022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,半纤维素(hemicellulose, HC)含量根据公式: $HC=NDF-ADF$ 计算^[14];采用Anthrone比色法测定可溶性碳水化合物(water soluble carbohydrates, WSC)含量^[15]。

1.4.3 发酵品质测定 从每袋样品另取20 g置于锥形瓶中,各加80 mL蒸馏水,于4 °C冰箱冷藏浸提24 h后取出,过滤、离心后留取上清液待测。使用PHS-3C型pH计(杭州奥立龙仪器有限公司)测定青贮料浸提液的pH值;采用苯酚一次氯酸钠比色法(FOSS Kjeltac™ 8400全自动凯氏定氮仪)测定氨态氮(NH₃-N)含量^[16];采用依利特EClassical 3200高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司)测定乳酸(lactic acid, LA)、乙酸(acetic acid, AA)、丙酸(propionic acid, PA)、丁酸(butyrate acid, BA)含量^[17]。

1.4.4 微生物多样性检测 青贮开袋后将袋内样品混匀,取适量样品,采用CTAB法提取样本的基因组DNA,并测定DNA的纯度和浓度,使用无菌水将样本DNA稀释至1 ng·μL⁻¹。以稀释后的基因组DNA为模板,对16S V4、18S V4和ITS1三个区域进行PCR扩增。对所得PCR产物进行磁珠纯化,酶标定量和均一化,构建测序文库。文库经Qubit和qPCR定量合格后,基于Illumina NovaSeq测序平台对文库进行双末端测序。对测序得到的原始数据使用fastp软件处理得到高质量的数据,并与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列,去除其中

的嵌合体序列,得到最终的有效数据。

1.5 数据统计分析

用Excel对试验数据进行初步整理,再采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行方差分析,差异显著者采用Duncan氏法进行多重比较,结果以“平均值±标准差(mean±standard deviation)”表示, $P<0.05$ 为差异显著。对测序所得的有效数据进行操作性分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类分析,利用Mothur方法与SSUrRNA数据库(SILVA138.1)对OTUs序列进行物种注释分析。对各样本的有效数据进行均一化处理,使用Qiime软件(Version 1.9.1)计算Observed-species(OTUs数目)、Chao1指数、ACE指数、覆盖度(coverage),分析Alpha多样性;计算Unifrac距离、构建非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)样本聚类树,分析Beta多样性,使用R软件(Version 2.15.3)绘制主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)图;使用R软件分析Alpha、Beta多样性指数组间差异,并进行Tukey检验、Wilcox检验以及Spearman相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮感官性状的影响

各组蚕豆秸秆经过30d的青贮发酵,青贮料品质均良好,无霉变现象。由表1可知,CK组青贮料感官质量评分总分为13分,评定等级为2级(尚好);其余各添加剂处理组感官质量评分总分为18~20分,评定等级均为1级(优良)。由此可见,各添加剂处理组青贮料的感官质量评价优于CK组,说明添加剂处理有利于提高蚕豆秸秆青贮的感官质量。

表1 各组青贮料的感官质量评价

Table 1 Sensory quality evaluation of silage in various groups

组别 Group	色泽 Color		气味 Smell		结构 Texture		综合评价 Comprehensive evaluation	
	描述 Description	得分 Score	描述 Description	得分 Score	描述 Description	得分 Score	总分 Total score	等级 Grade
	CK	黄绿色 Yellow-green	1	酸味稍刺鼻 SHAS	10	叶子结构保持较差 PMLS	2	13
T ₁	黄绿色 Yellow-green	1	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	19	1
T ₂	绿色 Green	2	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	20	1
T ₃	绿色 Green	2	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	20	1
T ₄	绿色 Green	2	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	20	1
T ₅	绿色 Green	2	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	20	1
T ₆	黄绿色 Yellow-green	1	酸香味 CAS	14	茎叶结构保持良好 GSLS	4	19	1
T ₇	绿色 Green	2	酸香味 CAS	14	叶子结构保持较差 PMLS	2	18	1

SHAS: Slight harsh acid smell; CAS: Comfortable acid smell; GSLS: Good stem and leaf structure; PMLS: Poor maintenance of leaf structure; 1: 1级(优良) Grade 1 (excellent); 2: 2级(尚好) Grade 2 (good); CK: 对照组 The control group; T₁: 3%蔗糖组 The 3% sucrose group; T₂: 乳酸菌组 The lactic acid bacteria group; T₃: 乳酸菌+3%蔗糖组 The lactic acid bacteria+3% sucrose group; T₄: 乳酸菌+0.2%柠檬酸组 The lactic acid bacteria+0.2% citric acid group; T₅: 0.2%柠檬酸组 The 0.2% citric acid group; T₆: 0.03% NaCl组 The 0.03% NaCl group; T₇: 0.1% VC组 The 0.1% VC group; 下同 The same below.

2.2 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮营养成分的影响

与对照组相比,各添加剂处理组间的DM含量,以及T₁、T₂、T₃和T₄组的CP含量无显著差异($P>0.05$),T₅、T₆和T₇组的CP含量显著降低($P<0.05$),T₃组的ADF含量显著降低($P<0.05$),T₃、T₄和T₆组的WSC含量显著提高($P<0.05$)。以上结果说明,不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮营养成分的影响不同,其中乳酸菌与3%蔗糖的组合添加剂对蚕豆秸秆青贮营养成分的影响较为明显(表2)。

表2 各组青贮料的营养成分

Table 2 Nutrient composition of silage in various groups

组别 Group	干物质 DM (%FM)	粗蛋白 CP (%DM)	中性洗涤纤维 NDF (%DM)	酸性洗涤纤维 ADF (%DM)	半纤维素 HC (%DM)	可溶性碳水化合物 WSC (g·kg ⁻¹ DM)
CK	29.85±0.79a	9.70±0.15a	36.23±1.48a	12.83±0.81a	23.40±0.85a	6.49±0.28cd
T ₁	30.66±0.53a	9.08±0.35abc	34.42±0.84a	12.44±0.33a	21.98±0.68a	6.46±0.19cd
T ₂	29.30±5.48a	9.53±0.32ab	35.64±0.94a	12.67±0.20a	22.97±0.96a	7.13±0.38bc
T ₃	31.80±1.16a	9.34±0.42abc	34.55±1.09a	9.74±2.99b	24.82±4.07a	7.99±0.46a
T ₄	30.71±0.35a	9.55±0.18ab	34.70±2.92a	11.78±1.34ab	22.92±1.70a	7.26±0.69b
T ₅	27.90±0.59a	9.03±0.45bc	35.17±1.29a	12.81±0.46a	22.37±0.82a	6.31±0.23d
T ₆	30.31±0.98a	8.75±0.04c	35.84±0.69a	13.05±0.10a	22.79±0.63a	7.39±0.22ab
T ₇	29.50±0.55a	8.81±0.47c	36.60±0.69a	13.17±0.24a	23.42±0.54a	6.26±0.42d

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: Different lowercase letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$), the same below.

2.3 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮发酵品质的影响

与对照组相比,各添加剂处理组间的PA含量无显著差异($P>0.05$,表3),T₇组BA含量显著升高($P<0.05$);除T₁组外,其余6个添加剂处理组的pH值均有不同程度的降低,其中T₂、T₃和T₄组的pH值均显著降低($P<0.05$);除T₁组外,其余6个添加剂处理组的LA含量均显著提高($P<0.05$),其中T₃组的LA含量最高;T₁、T₃、T₅、T₆和T₇组的AA含量显著提高($P<0.05$),T₄组的NH₃-N含量显著降低($P<0.05$)。以上结果说明,添加剂处理对蚕豆秸秆青贮发酵品质有显著的影响,其中同时添加乳酸菌与3%蔗糖在降低蚕豆秸秆青贮料的pH值和提高LA、AA含量上效果最佳。

表3 各组青贮料的发酵品质

Table 3 Fermentation quality of silage in various groups

组别 Group	pH	乳酸 LA (g·kg ⁻¹ DM)	乙酸 AA (g·kg ⁻¹ DM)	丙酸 PA (%DM)	丁酸 BA (%DM)	氨态氮 NH ₃ -N (g·kg ⁻¹ DM)
CK	4.57±0.06a	34.65±6.46d	0.17±0.05e	0.31±0.11a	0.12±0.00b	0.17±0.01a
T ₁	4.57±0.06a	37.99±6.26cd	0.41±0.09a	0.31±0.08a	0.16±0.06ab	0.15±0.01a
T ₂	4.43±0.06bc	52.15±0.54ab	0.18±0.03de	0.34±0.07a	0.16±0.06ab	0.15±0.03a
T ₃	4.37±0.06c	55.71±5.89a	0.25±0.03cd	0.37±0.04a	0.09±0.02b	0.13±0.01ab
T ₄	4.40±0.00c	45.46±5.86bc	0.20±0.03cde	0.32±0.05a	0.09±0.01b	0.08±0.03b
T ₅	4.50±0.00ab	48.26±3.69ab	0.34±0.02ab	0.33±0.10a	0.18±0.04ab	0.15±0.03a
T ₆	4.53±0.06a	49.61±0.62ab	0.25±0.03cd	0.41±0.01a	0.18±0.04ab	0.16±0.07a
T ₇	4.50±0.00ab	47.04±0.94b	0.27±0.01bc	0.27±0.11a	0.18±0.03a	0.17±0.00a

2.4 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮菌群结构的影响

2.4.1 蚕豆秸秆青贮菌群的物种分布情况 在属水平上(图1A),各组青贮料的优势菌(相对丰度前10者)均为肠杆菌属(*Enterobacter*)、乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、泛菌属(*Pantoea*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、科萨克氏菌属(*Kosakonia*),以及少量的假单胞菌属(*Pseudomonas*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)和促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*);其中,T₃、T₅、T₇组的乳植杆菌属、片球菌属和魏斯氏菌属等3种乳酸菌总相对丰度为46.7%~55.4%,高于CK组(37%)。从种水平来看(图1B),各组相对丰度较高的主要是植物乳杆菌、戊糖片球菌、类肠膜魏斯氏菌、粘质沙雷氏菌和其他。

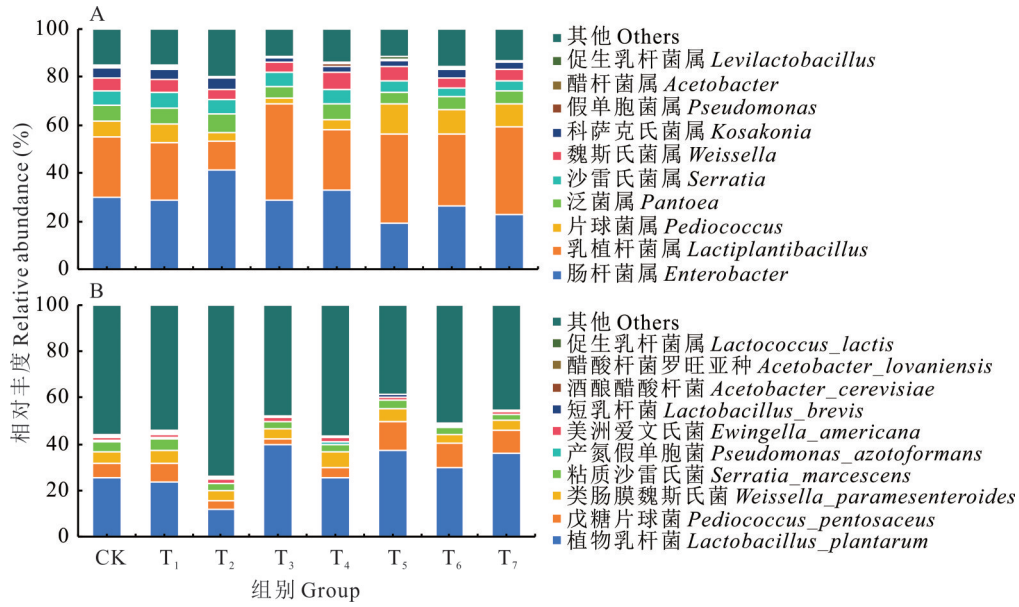


图 1 蚕豆秸秆青贮菌群属水平(A)和种水平(B)上的物种相对丰度(前10)

Fig. 1 Species relative abundance of microbial communities at genus level (A) and species level (B) in broad bean straw silage (top 10)

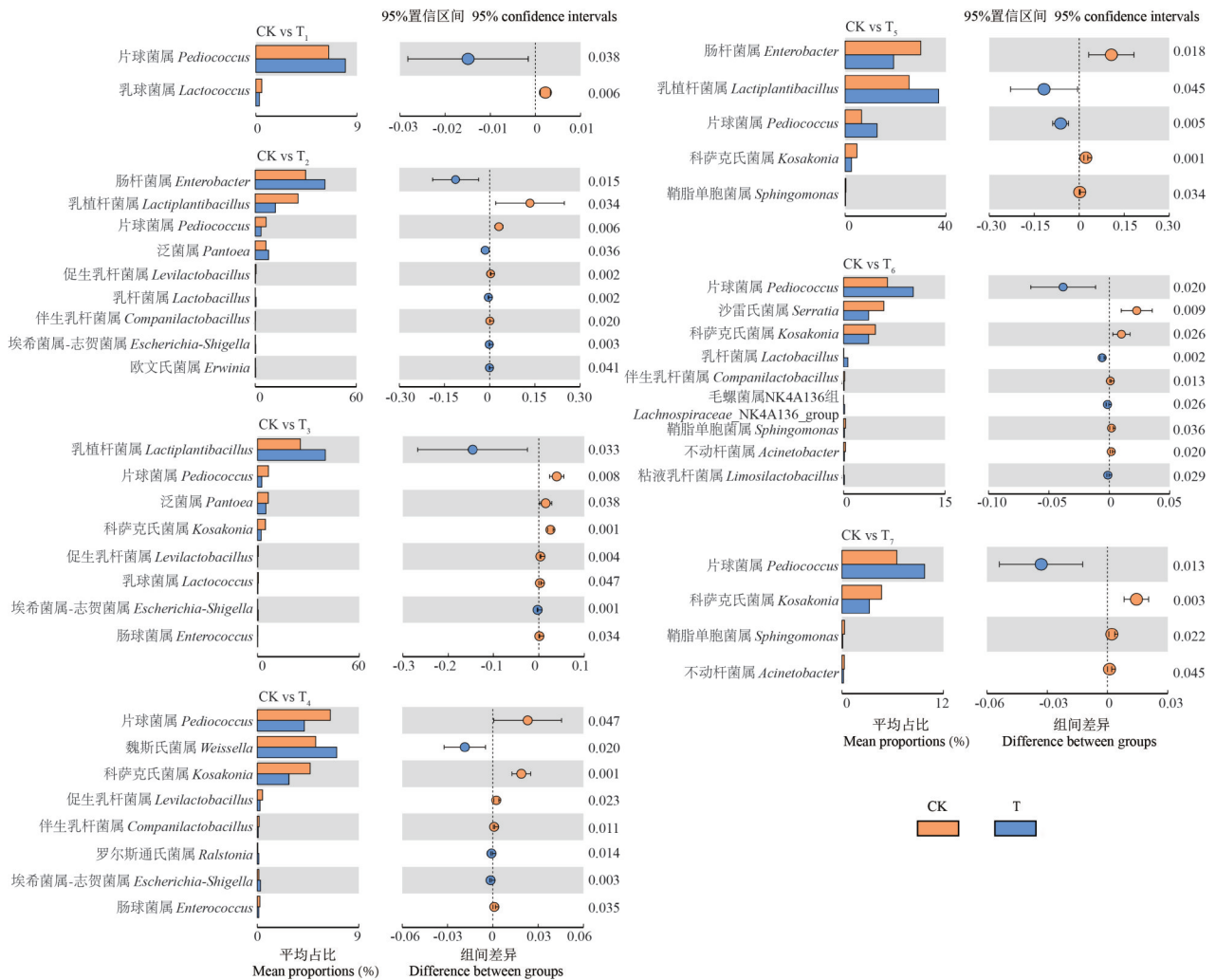


图 2 蚕豆秸秆青贮菌群在属水平上的比较分析

Fig. 2 Comparative analysis of microbial community at genus level in broad bean straw silage

T₃和T₅组乳植杆菌属的相对丰度显著高于CK组($P < 0.05$,图2),T₁、T₅、T₆、T₇组片球菌属的相对丰度显著高于CK组($P < 0.05$),T₂组肠杆菌属以及T₄组魏斯氏菌属的相对丰度显著高于CK组($P < 0.05$),而T₂组乳植杆菌属和T₅组肠杆菌属的相对丰度较CK组显著降低($P < 0.05$)。

乳植杆菌属、片球菌属和促生乳杆菌属等乳酸菌在CK组样本中聚集较少,而在T₄组样本中聚集较多(图3);广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)、伴生乳杆菌属(*Companilactobacillus*)、鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)、醋杆菌属等在CK组样本中聚集较少,而在T₃组样本中聚集较多;T₁和T₂组样本中的微生物种类分布范围较为广泛,T₅、T₆、T₇组则分别以埃希菌属-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)、乳杆菌属和乳植杆菌属、联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)为主要聚集菌群。

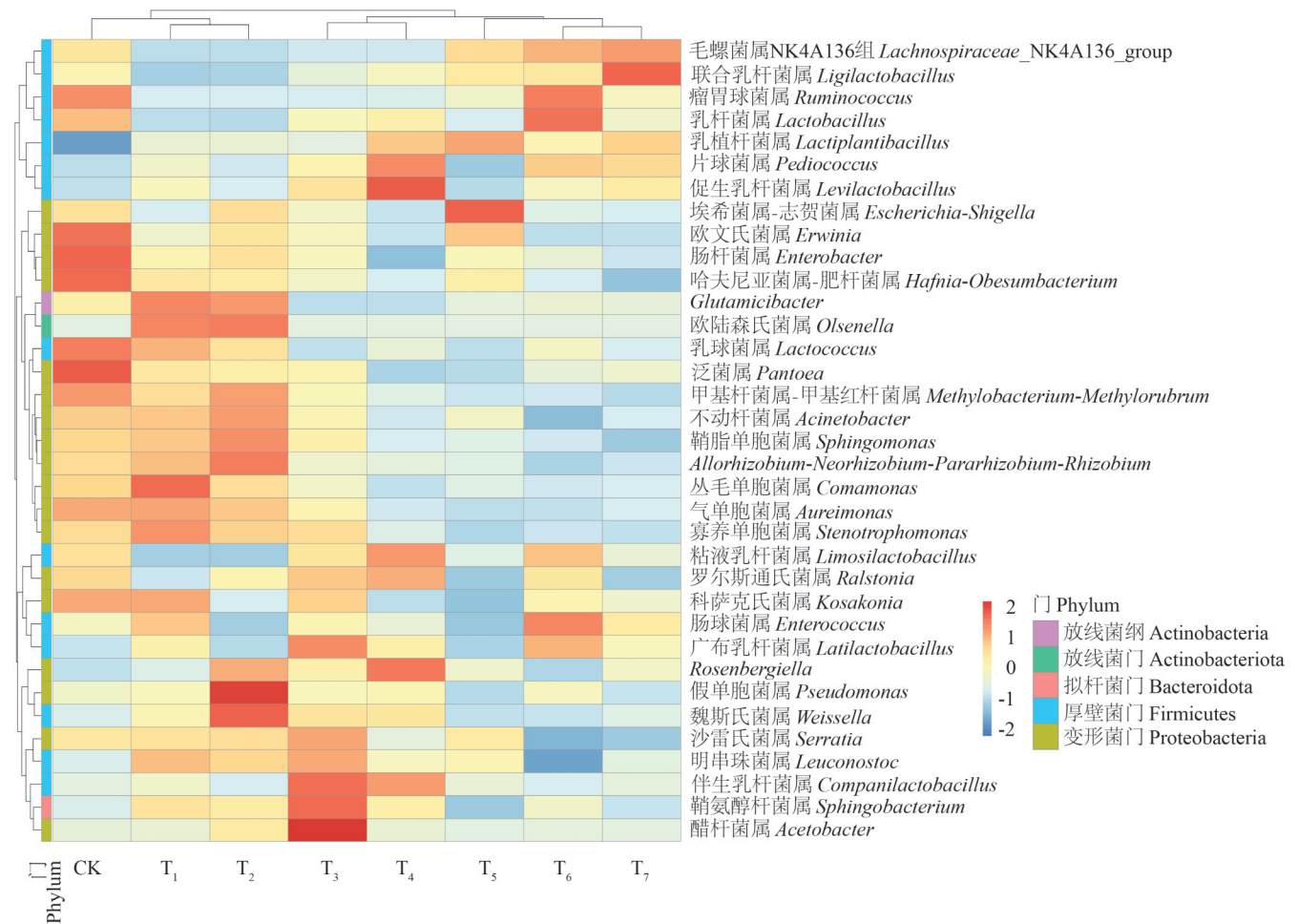


图3 蚕豆秸秆青贮微生物在属水平上的物种聚类热图

Fig. 3 Species clustering heat map of microbial communities at genus level in broad bean straw silage

2.4.2 蚕豆秸秆青贮菌群 Alpha多样性分析 Alpha多样性主要关注局域均匀生境下的物种数目,用以表征样品中物种分布的多样性和均匀度。本试验所有样本的覆盖度均在0.99以上,说明测序数据量足够大,可以反映样品中绝大多数的微生物信息(图4)。T₁和T₃组的OTUs数目均在300以上,其中T₁组的OTUs数目显著高于CK组($P < 0.05$);且T₁、T₃组的Chao1指数和ACE指数均显著高于CK组($P < 0.05$),表明3%蔗糖或乳酸联合3%蔗糖处理可有效增加蚕豆秸秆青贮中的微生物数量,提高微生物群落多样性。

2.4.3 蚕豆秸秆青贮菌群 Beta多样性分析 通过主成分分析比较不同样本之间群落结构的相似性(图5)。各组蚕豆秸秆青贮微生物群落聚集在不同的区域内,表明不同添加剂处理的蚕豆秸秆青贮微生物菌群结构存在明显差异。CK组样本群落聚集在主坐标图的中心位置,各组样本群落在PC1轴和PC2轴上都与CK组有清晰的

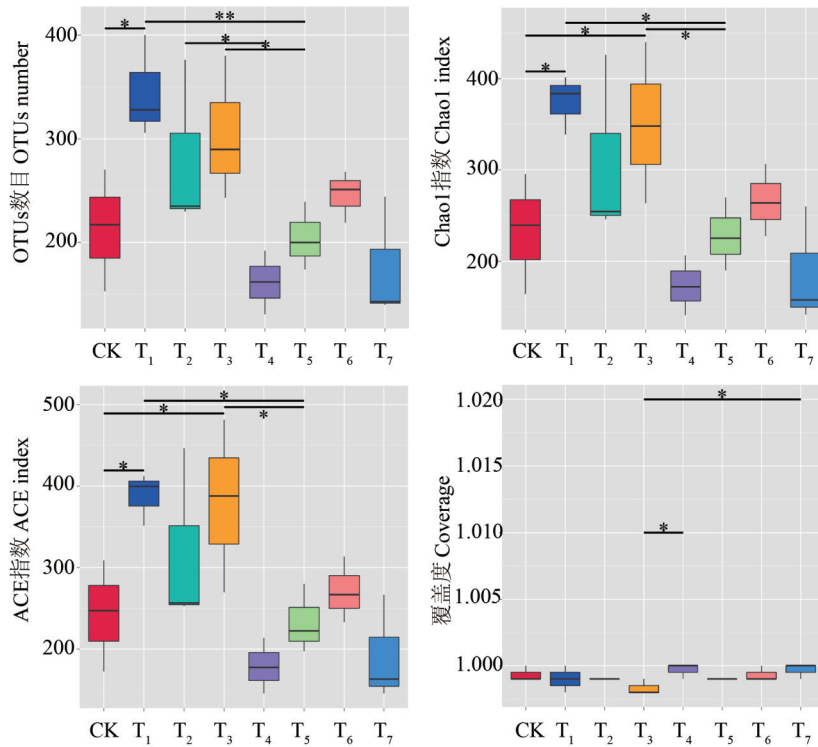


图 4 蚕豆秸秆青贮菌群的 Alpha 多样性指数差异

Fig. 4 Alpha diversity index difference of microbial communities in broad bean straw silage

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

间隔距离,表明组间群落样本在第一、二主坐标维度上都具有差异,第一主坐标解释了约 68.96% 的样本间差异,而第二主坐标则解释了约 14.81% 的样本间差异。

3 讨论

3.1 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮感官品质的影响

感官评定是对青贮饲料物理质量评价的一种简单、直观的方法。根据 DLG 青贮饲料感官评定标准,气味芳香、茎叶结构保持良好、颜色与原料相似可被评定为优良等级^[13]。本研究中,添加剂处理的蚕豆秸秆青贮料开封后颜色与原料接近,茎叶结构保持较好,整体紧密但不发粘,搅动后呈松散状态,气味酸香不刺鼻,感官评定总分优于对照组,说明添加剂处理能够有效抑制褐变,防止青贮料腐败变质,使蚕豆秸秆青贮的感官品质得以提升。由于常规青贮条件下,青贮植物细胞壁的降解和微生物发酵等过程会直接影响青贮饲料的品质,而使用添加剂可以对青贮过程进行调控^[3]。例如,廖隼锐等^[18]以分离自青贮巨菌草(*Pennisetum giganteum*)的乳酸菌 R-01 作为添加剂发酵的蚕豆秸秆饲料保持了青贮原料的颜色,减少了刺鼻酸味,提高了青贮蚕豆秸秆的感官评价。杨福华等^[19]发现,添加筛选自新鲜育肥猪粪的芽孢杆菌 YF-15 可明显提高蚕豆秸秆发酵物的风味,蚕豆秸秆青贮感官品质达到优良水平,而未使用添加剂的对照组感官品质为中等,本研究结果与之相似。

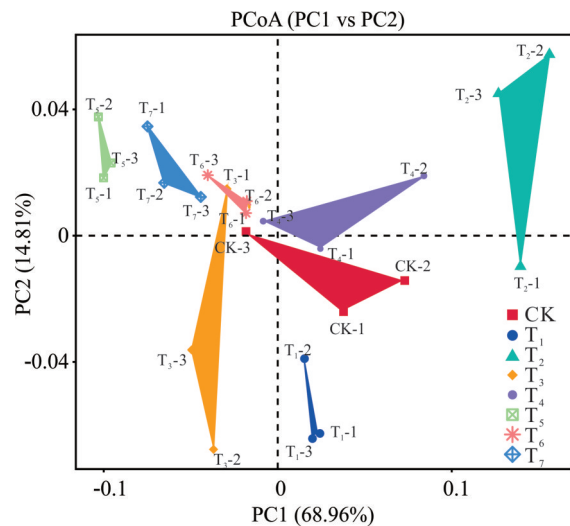


图 5 蚕豆秸秆青贮菌群群落的 PCoA 图

Fig. 5 PCoA plot of microbial communities in broad bean straw silage

3.2 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮营养品质和发酵品质的影响

在常规青贮条件的基础上,利用不同的青贮添加剂对发酵过程进行调控能够增加营养成分和回收能量,减少发酵损失,提高发酵效率,改善青贮饲料的营养品质^[20]。本研究中,乳酸菌制剂、蔗糖以及二者组合的处理组中,DM和CP含量较对照组均无显著变化,但乳酸菌组的LA含量明显更高,pH值明显更低,并且乳酸菌制剂与蔗糖组合添加处理时,WSC和AA含量均显著增加,同时ADF含量显著降低,说明添加乳酸菌制剂能够较好地保持蚕豆秸秆青贮的营养成分并提高其发酵品质,且与单一添加剂相比,乳酸菌制剂与蔗糖联合使用在这方面的作用更具优势。这是由于乳酸菌制剂能够以增加乳酸菌数量的方式使青贮料更快进入LA发酵阶段,促进LA和AA两个关键有机酸的产生,降低pH值,抑制有害微生物的生长,减少青贮饲料营养损失,提高发酵效果^[21]。蔗糖是糖蜜的主要成分,青贮时加入蔗糖能够有效防止WSC和DM降解,降低青贮料的pH值,并加速NDF和ADF的降解程度,改善青贮品质^[22]。但由于单独糖蜜处理的青贮有氧稳定性比较差,因而将糖蜜作为青贮添加剂时也需联合其他添加剂,以便在促进发酵的同时避免因有氧稳定性差而导致腐败变质^[3,23]。如Li等^[24]和Li等^[25]用糖蜜和乳酸菌联合处理的青贮料比糖蜜单独处理的青贮料有更低的pH及更高的LA产量,本研究结果与之一致。

3.3 不同添加剂处理对蚕豆秸秆青贮微生物多样性的影响

青贮发酵是一个微生物动态变化的复杂过程,微生物的组成和数量决定了微生物菌群结构及其多样性,并直接影响青贮发酵品质与营养成分^[26-29]。本研究通过16S rDNA扩增子测序技术,分析不同添加剂处理的蚕豆秸秆青贮料上附着的微生物物种丰度和群落组成差异,以揭示微生物的多样性。

试验中,各组青贮开封后测得样品的测序深度指数(覆盖度)皆趋近于1,说明本次测序结果数据足以代表样品中微生物的真实情况。蔗糖、乳酸菌组青贮料中微生物群落的Chao1指数和ACE指数均明显高于对照组,尤其是乳酸菌制剂与蔗糖联合使用的影响更显著,在属水平的物种分布上表现为乳植杆菌属、广布乳杆菌属和伴生乳杆菌属等乳酸菌的相对丰度增高,说明添加乳酸菌制剂与蔗糖提高了蚕豆秸秆青贮微生物的Alpha多样性。乳酸菌是青贮发酵过程中的主要微生物,尤其是在发酵初期,但大部分牧草本身附着的乳酸菌数量有限,不易成为发酵过程中的优势菌群,而外源添加乳酸菌改变了细菌群落结构,使乳酸菌成为青贮的主要功能细菌,促进LA发酵过程,加上营养性添加剂的辅助,既保持了牧草青贮的营养价值也提高了青贮发酵品质^[30-32]。另外,相比于对照组,柠檬酸组青贮料中乳植杆菌属增加显著,而肠杆菌属有明显的减少,这可能是由于添加柠檬酸形成的酸性发酵环境更有利于乳酸菌的繁殖。

在Beta多样性分析中,各组样品的微生物群落存在明显分离现象,不同添加剂组的微生物聚集区域与对照组的微生物聚集区域距离大小有明显差异,区域之间间隔清晰,这表明不同添加剂对蚕豆秸秆青贮饲料附着的微生物群落组成和结构有不同的影响。这些结果进一步表明,使用添加剂不同程度上提高了蚕豆秸秆青贮的微生物多样性。

4 结论

本研究结果表明,乳酸菌制剂、蔗糖、柠檬酸、NaCl以及VC等添加剂均能较好地保持蚕豆秸秆青贮饲料的营养价值,不同程度地提高青贮发酵品质和微生物多样性。其中,乳酸菌与蔗糖的组合添加剂对蚕豆秸秆青贮的处理效果最优。该处理方式能够有效改善蚕豆秸秆青贮品质,可作为适用于蚕豆秸秆青贮的专用添加剂。

参考文献 References:

- [1] Xu X Y, Li A P, Wu L Y, *et al.* Advances on the utilization of straws from *Vicia faba*. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(2): 204-207.
徐晓俞, 李爱萍, 吴凌云, 等. 蚕豆秸秆综合利用研究进展. 福建农业学报, 2015, 30(2): 204-207.
- [2] Qu L L, Liu F, Wang C, *et al.* Research progress on effect of silage additives on natural forage silage. Feed Research, 2024, 47(4): 158-161.
屈璐璐, 刘芳, 王超, 等. 青贮添加剂对天然牧草青贮影响的研究进展. 饲料研究, 2024, 47(4): 158-161.
- [3] Bao W H, Bu D P, Zhou L Y, *et al.* Research progress on application of silage additives. China Animal Husbandry & Veterinary

- Medicine, 2012, 39(8): 124–128.
- 包万华, 卜登攀, 周凌云, 等. 青贮饲料添加剂应用的研究进展. 中国畜牧兽医, 2012, 39(8): 124–128.
- [4] Xu H W, Sun L, Na N, *et al.* Dynamics of bacterial community and fermentation quality in *Leymus chinensis* silage treated with lactic acid bacteria and/or water. *Frontiers Microbiology*, 2021, 12: 717120.
- [5] Zhang J W, Liu Y C, Wang Z J, *et al.* Effects of different types of LAB on dynamic fermentation quality and microbial community of native grass silage during anaerobic fermentation and aerobic exposure. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 513.
- [6] Wu B Y, Hu Z F, Wei M L, *et al.* Effects of inoculation of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lentilactobacillus buchneri* on fermentation quality, aerobic stability, and microbial community dynamics of wilted *Leymus chinensis* silage. *Frontiers Microbiology*, 2022, 13: 928731.
- [7] Hu Z F, Ma D Y, Niu H X, *et al.* Enzyme additives influence bacterial communities of *Medicago sativa* silage as determined by Illumina sequencing. *AMB Express*, 2021, 11(1): 5.
- [8] Wang W, Zhou T R, Xiao Y Z, *et al.* Effects of additives on quality of natural grass silage. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(6): 143–148.
- 王伟, 周天荣, 肖燕子, 等. 添加剂对天然牧草青贮品质的影响. 中国草地学报, 2023, 45(6): 143–148.
- [9] Xue Z L, Song L M, Huang B Z. Effects of adding urea or salt on silage quality of *Sorghum vulgare* × *S. sudanense*. *Chinese Journal of Grassland*, 2014, 36(1): 75–78.
- 薛祝林, 宋丽梅, 黄必志. 添加尿素或食盐对高丹草青贮品质的影响. 中国草地学报, 2014, 36(1): 75–78.
- [10] Guo H M, Xia T C, Zhu W, *et al.* Effect of additives on the quality and aerobic stability of rice straw silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(2): 190–196.
- 郭海明, 夏天婵, 朱雯, 等. 青贮添加剂对稻草青贮品质和有氧稳定性的影响. 草业学报, 2017, 26(2): 190–196.
- [11] Jiang Y, Shen W R, Han L P, *et al.* Application research of organic acids and salts in vegetable and fruit color fixating and avoid the browning. *Applied Chemical Industry*, 2007(6): 534–536.
- 江莹, 沈卫荣, 韩丽萍, 等. 有机酸及相关盐类在果蔬护色、防褐变中的应用研究. 应用化工, 2007(6): 534–536.
- [12] Han X L, Shi W J, Zhang J, *et al.* Effects of citric acid addition on nutritional quality and fermentation characteristics of *Chamaecrista rotundifolia* silage. *Pratacultural Science*, 2021, 38(9): 1762–1770.
- 韩雪林, 史文娇, 张娟, 等. 柠檬酸添加剂对圆叶决明青贮饲料营养品质与发酵特性的影响. 草业科学, 2021, 38(9): 1762–1770.
- [13] Yan W M, Chen Y K, Yang P B, *et al.* Research progress on quality assessment methods of silage. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(1): 135–144.
- 闫威明, 陈雅坤, 杨鹏标, 等. 青贮饲料质量评定方法研究进展. 中国畜牧兽医, 2024, 51(1): 135–144.
- [14] 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.
- [15] Chen X Z, Dong Z X, Zhang J G. Silage carbon sources preferred by epiphytic lactic acid bacteria. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39(5): 512–521.
- 陈鑫珠, 董朝霞, 张建国. 饲草附生乳酸菌对碳源的选择性. 福建农业学报, 2024, 39(5): 512–521.
- [16] 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.
- [17] Han K, Collins M, Vanzant E S, *et al.* Bale density and moisture effects on alfalfa round bale silage. *Crop Science*, 2004, 44(3): 914–919.
- [18] Liao J R, Liu S N, Huo J L, *et al.* Isolation, identification of a lactic acid bacteria strain and its effect on fermentation of broad bean straw silage. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2023, 38(6): 966–972.
- 廖隽锐, 刘韶娜, 霍金龙, 等. 青贮巨菌草乳酸菌的分离鉴定及其对蚕豆秸秆青贮发酵的效果. 云南农业大学学报(自然科学版), 2023, 38(6): 966–972.
- [19] Yang F H, Liu S N, Liao J R, *et al.* Screening and identification of *Bacillus* YF-15 and its effect on nutritional quality of faba bean straw. *Feed Research*, 2023, 46(9): 121–125.
- 杨福华, 刘韶娜, 廖隽锐, 等. 芽孢杆菌 YF-15 的筛选、鉴定及对蚕豆秸秆青贮营养品质的影响. 饲料研究, 2023, 46(9): 121–125.
- [20] Oladosu Y, Rafii M Y, Abdullah N, *et al.* Fermentation quality and additives: a case of rice straw silage. *Biomed Research International*, 2016, 7985167.
- [21] Jin H Z, Zhao Y P, Chen A H. Effects of different microbial agents on the fermentation quality and nutrient contents of corn straw silage. *China Feed*, 2018(6): 16–20.

- 靳会珍, 赵月萍, 陈爱华. 不同微生物菌剂对青贮玉米秸秆发酵品质和营养成分的影响. 中国饲料, 2018(6): 16—20.
- [22] Kang J H, Tang S X, Zhong R Z, *et al.* Alfalfa silage treated with sucrose has an improved feed quality and more beneficial bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 670165.
- [23] Huisden C M, Adesogan A T, Kim S C, *et al.* Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(2): 690—697.
- [24] Li M, Zi X J, Zhou H L, *et al.* Effect of lactic acid bacteria, molasses, and their combination on the fermentation quality and bacterial community of cassava foliage silage. *Animal Science Journal*, 2021, 92(1): e13635.
- [25] Li Y, Du S, Sun L, *et al.* Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on dynamic fermentation quality and microbial community of native grass silage. *Frontiers Microbiology*, 2022, 13: 830121.
- [26] Huang X W, Fan X, Tang M H, *et al.* Research progress of effects of additives on the quality of forage grass silage. *Feed Industry*, 2023, 44(17): 81—85.
黄秀文, 范雪, 唐明欢, 等. 青贮添加剂对牧草青贮品质影响的研究进展. 饲料工业, 2023, 44(17): 81—85.
- [27] Liu Y, Zi X J, Chen T, *et al.* Research progress and countermeasure on microbial diversity of forage silage. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(11): 6084—6092.
刘悦, 字学娟, 陈婷, 等. 饲草青贮微生物多样性研究进展及对策. 动物营养学报, 2021, 33(11): 6084—6092.
- [28] Nazar M, Ullah M W, Wang S, *et al.* Exploring the epiphytic microbial community structure of forage crops: their adaptation and contribution to the fermentation quality of forage sorghum during ensiling. *Bioengineering*, 2022, 9(9): 428.
- [29] Zhou Y, Drouin P, Lafreniere 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.
- [30] Chen M Y, Bai J, Ke W C, *et al.* Research advances in silage microbial communities and functions. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(9): 11—23.
陈梦言, 白洁, 柯文灿, 等. 青贮饲料微生物群落组成与功能研究进展. 生物技术通报, 2021, 37(9): 11—23.
- [31] Li X Y, Dong Y, You H Y, *et al.* Effects of different types of additives on quality of corn straw silage. *Feed Research*, 2024, 47(5): 99—103.
李旭业, 董扬, 尤海洋, 等. 不同类型添加剂对玉米秸秆青贮品质的影响. 饲料研究, 2024, 47(5): 99—103.
- [32] Mu L C, Zhan X, Hu L X, *et al.* *Lactobacillus plantarum* and molasses alter dynamic chemical composition, microbial community, and aerobic stability of mixed (amaranth and rice straw) silage. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(12): 5225—5235.