

DOI:10.11686/cyxb2025168

http://cyxb.magtech.com.cn

尹含雪, 黄海贝, 钟文锐, 等. 不同乳酸菌对象草青贮品质及四环素抗性基因的影响. 草业学报, 2026, 35(1): 170—178.

YIN Han-xue, HUANG Hai-bei, ZHONG Wen-rui, et al. Effects of different lactic acid bacteria on silage quality and tetracycline resistance genes in elephant grass. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(1): 170—178.

不同乳酸菌对象草青贮品质及四环素抗性基因的影响

尹含雪, 黄海贝, 钟文锐, 张庆, 姚旋*

(华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

摘要:本研究旨在探讨青贮时添加不同乳酸菌对象草品质及其四环素抗性基因的影响。试验采用完全随机区组设计,以象草为青贮原料,以乳酸菌作为添加剂。共设6个处理,不添加菌液处理作为对照组(CK)。处理组为添加不同菌液,分别为植物乳杆菌处理组(菌株A,LA)、植物乳杆菌处理组(菌株B,LB)、宜春乳酪杆菌处理组(LC)、戊糖片球菌处理组(LD)和棒状腐败乳杆菌处理组(LE)。青贮30 d后开袋取样,测定营养品质、抗生素抗性基因(ARGs)。结果表明,象草青贮过程中添加不同乳酸菌,所有处理组的pH均显著低于对照组($P<0.05$),同时乳酸含量均有所增加,其中LC处理组的增加尤为显著($P<0.05$)。部分处理显著降低了中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维(ADF)含量,LA、LB、LC、LD处理组的ADF含量均显著低于对照组($P<0.05$)。在青贮30 d后,所有处理组的氨态氮含量均显著低于对照组($P<0.05$)。试验表明,添加乳酸菌青贮后与未添加的对照组相比,四环素抗性基因(TRGs)与可移动遗传原件(MGEs)的绝对丰度显著下降($P<0.05$),其中*tetA*、*tetX*、*tetM*、*tetW*和*tetK*的绝对丰度与*intl1*呈极显著的正相关关系($P<0.01$),且LC与LB处理组的TRGs绝对丰度显著下降($P<0.05$),推断出添加宜春乳酪杆菌和植物乳杆菌有助于降低青贮象草的TRGs。综上所述,添加不同乳酸菌有助于提高青贮象草营养品质,可以减少四环素抗性基因污染。

关键词:象草;乳酸菌;青贮;四环素抗性基因

Effects of different lactic acid bacteria on silage quality and tetracycline resistance genes in elephant grass

YIN Han-xue, HUANG Hai-bei, ZHONG Wen-rui, ZHANG Qing, YAO Xuan*

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In this study, we investigated the effects of different lactic acid bacteria (LAB) on the fermentation quality and tetracycline resistance genes (TRGs) in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) silage. Elephant grass was ensiled with six different treatments applied in a completely randomized block design. The six treatments were as follows: a control group (CK) without bacterial inoculant, and five LAB-treatment groups: a *Lactiplantibacillus plantarum* treatment group (strain A, LA), a *L. plantarum* treatment group (strain B, LB), a *Lacticaseibacillus yichunensis* treatment group (LC), a *Pediococcus pentosaceus* treatment group (LD), and the *Loigolactobacillus coryniformis* treatment group (LE). Following 30 days of ensiling, bags were opened and the contents were sampled to analyze the nutritional parameters of the silage and the abundance of antibiotic resistance genes (ARGs). It was found that, compared with CK, all the LAB-treatment groups exhibited significantly lower pH ($P<0.05$) and

收稿日期:2025-04-30;改回日期:2025-06-04

基金项目:梅州市科技计划项目(2024A0301041)资助。

作者简介:尹含雪(2000—),女,江苏徐州人,在读硕士。E-mail: 15162080901@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yaoxuan@scau.edu.cn

elevated lactic acid content. Notably, the LC group demonstrated a marked increase in lactic acid content ($P < 0.05$). Compared with the CK, some treatment groups showed significantly decreased contents of neutral detergent fiber and acid detergent fiber (ADF). Specifically, the ADF content was significantly lower in the LA, LB, LC, and LD groups than in CK ($P < 0.05$). The ammonia-nitrogen content was significantly lower in all LAB treatments than in CK after the 30-day ensiling period ($P < 0.05$). Importantly, LAB supplementation significantly decreased the absolute abundance of both TRG and mobile genetic elements (MGEs), compared with CK ($P < 0.05$). We detected strong positive correlations between the expression of the integron gene *intl1* and the absolute expression levels of *tetA*, *tetX*, *tetM*, *tetW*, and *tetK* ($P < 0.01$). The LC and LB groups showed the largest reductions in the absolute abundance of TRGs, compared with CK ($P < 0.05$), indicating that *L. yichunensis* and *L. plantarum* are particularly effective in suppressing TRGs. In conclusion, specific lactic acid bacteria strains enhance the nutritional quality of elephant grass silage while mitigating contamination with TRGs.

Key words: elephant grass; lactic acid bacteria; silage; tetracycline resistance genes

由于抗生素的大量滥用,环境中存在的抗生素基因和抗生素细菌加剧了抗生素耐药性传播的风险。抗生素在环境中的传播已经引起了公众和研究机构的广泛关注,抗生素耐药性与人类健康密切相关。且随着畜牧业的快速发展,提高饲料品质成为当前畜牧业生产的重要问题^[1]。在全球气候变化和资源环境约束日益严峻的背景下,象草(*Pennisetum purpureum*)作为一种高产、优质、适应性强的热带牧草,近年来在青贮饲料领域展现出巨大的潜力,为热带地区畜牧业发展提供了新的解决方案。然而,由于南方地区气候多雨潮湿,干草的制作和保存相对困难,因此青贮成为一种更为适宜的保存方法。象草的水溶性碳水化合物含量较低,且粗纤维素含量较高^[2],加之多茎、空心、质地粗糙的特性,使其在青贮时难以被有效压实,容易滞留大量空气^[3]。青贮的制作和保存是畜牧业中一项关键技术,它通过在厌氧条件下发酵新鲜草料,以保持其营养价值,延长保存时间^[4]。然而,若厌氧环境建立缓慢,植物细胞的呼吸作用和好氧性微生物活动的持续时间延长,进而减少了乳酸菌发酵所需的底物,使青贮不易成功^[5]。为了解决这一问题,实际生产中常通过添加外源制剂优化发酵进程^[6]。并且青贮饲料中残留的抗生素、发酵过程中耐药菌的增殖以及添加剂携带的外源抗性基因,均可导致动物饲料成为抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的储存库。反刍动物通过长期摄入含 ARGs 的饲料,其肠道微生物群通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)整合耐药基因,形成耐药菌的生物富集效应。这种富集通过多种途径威胁人类健康。许多基因可以产生抗药性,但评估 ARGs 的相对健康风险是复杂的,ARGs 的丰度、横向传播的倾向以及在病原体中表达抗性的能力等因素都很重要^[7]。

乳酸菌作为青贮添加剂,可通过快速发酵产酸降低青贮环境 pH 值,抑制腐败菌及潜在病原菌的增殖,这些微生物通常携带或通过水平基因转移(HGT)传播 ARGs^[8]。同时,乳酸菌通过竞争性排斥作用占据生态位,减少微生物群落中 ARGs 宿主菌的生物量,并可能通过分泌细菌素等抑菌物质直接抑制耐药菌活性^[9]。此外,酸性环境及代谢产物可降低微生物细胞膜通透性,抑制质粒接合转移相关基因(*tra* 基因)表达。Zhang 等^[10]的研究中添加植物乳杆菌或布氏乳杆菌的苜蓿(*Medicago sativa*)青贮通过减少宿主菌数量及抑制质粒携带 ARGs 的富集,显著降低了总 ARGs 丰度以及多重药物,大环内酯类、林可酰胺类、链阳菌素 B 类抗性基因(macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance genes, MLS),万古霉素,氨基糖苷类,四环素含量和磷霉素抗性基因的丰度。钟珊^[11]通过试验表明,强力霉素的添加显著影响了堆肥中 *tet* 基因的丰度,其中 *tetG*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 的丰度则随堆肥时间延长逐渐降低。且四环素类抗生素抗性基因 *tetA* 和 *tetB* 在畜禽养殖环境中广泛存在,可能通过食物链向人类传播^[12]。不仅畜禽养殖业,水产养殖业也存在相似的情况,这些基因可能通过废水排放进入环境,对生态系统和人类健康构成威胁^[13]。系统探究乳酸菌对象草青贮中抗性基因丰度的调控作用,了解四环素抗性基因的分布对控制其传播至关重要^[14]。象草青贮饲料作为畜牧业中潜在的 ARGs 传播载体,解析象草青贮 ARGs 的动态分布

规律与传播特性,有利于保障动物源性食品,同时是防控抗性基因生态风险的重要科学命题。因此,本研究旨在评估不同乳酸菌对象草青贮营养成分、发酵品质及其四环素抗性基因的影响,为优化象草青贮提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料与amp;设计

象草采集于中国广东省广州市华南农业大学启林北试验田(23°19' N, 113°34' E),于2024年7月11日收割,在实验室用镰刀将其切割成2 cm左右的小段备用。本试验所添加的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是从青贮30 d的苜蓿表面经过分离和纯化而来,后通过获得16S rRNA序列信息与NCBI中的序列进行Blast同源比对,确定菌株种类。

试验于2024年7月15日开始青贮,在30 d后的8月15日进行开袋测定。试验采用完全随机区组设计:将菌粉用生理盐水配制成 1×10^6 cfu·g⁻¹ FM菌液,添加到象草原料中,以不添加处理作为对照组(CK),处理组添加不同菌液,分别为植物乳杆菌处理组(*Lactiplantibacillus plantarum*, 菌株 A, LA)、植物乳杆菌处理组(*L. plantarum*, 菌株 B, LB)、宜春乳酪杆菌处理组(*Lacticaeibacillus yichunensis*, LC)、戊糖片球菌处理组(*Pediococcus pentosaceus*, LD)、棒状腐败乳杆菌处理组(*Loigolactobacillus coryniformis*, LE)。混合均匀后装入聚乙烯塑料袋(20 cm×30 cm)中,每袋150 g左右,共24袋(6个处理×4个重复),用真空封口机(青叶真空包装机P290,中国)抽真空后室温密封保存,于30 d后开袋测定其青贮品质及基因含量。

1.2 青贮测定指标及amp;方法

青贮样品开袋后,将样品混匀,每袋样品取20 g用王成等^[15]方法进行微生物数量的测定。每袋样品取10 g于一20 °C冰箱中保存,用于青贮后微生物的DNA提取。每袋样品取10 g加入90 mL蒸馏水,混合均匀,放置于4 °C冰箱18 h后,中速定性滤纸过滤,得到浸提液,采用pH计(PHS-3C,上海仪电科学仪器有限公司)测量pH值^[16]。浸提液采用苯酚-次氯酸钠比色法^[17]测定氨态氮含量。浸提液经0.22 μm孔径的滤膜过滤得到滤液,采用GC-14型高效液相色谱仪(色谱柱:Shodex Rspak KC-811 s-DVBgel column;检测器:SPD-M10AVP,日本岛津)测定乳酸、乙酸、丙酸和丁酸含量,流动相为3 mmol·L⁻¹高氯酸,流速1 mL·min⁻¹;柱温50 °C;检测波长210 nm,进样量5 μL^[18]。开袋后,每袋取70 g左右放到65 °C烘箱烘48 h到恒重,以测定干物质(dry matter, DM)含量^[19]。烘干后将样品经粉碎机(津发微型植物粉碎机JF-300A,中国上海)粉碎,并过孔径0.425 mm筛,所得粉末状样品放于干燥处保存待测,采用Van Soest等^[20]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。可溶性碳水化合物(water-soluble carbohydrates, WSC)含量采用蒽酮比色法测定,制作葡萄糖标准曲线,将样品煮沸10 min,冷却过滤定容,经吸取摇匀后加入蒽酮,在620 nm波长下比色测定吸光度计算可得^[21]。

1.3 样品DNA提取与amp;荧光定量PCR

1.3.1 DNA提取 使用PowerSoil® DNA提取试剂盒(PowerSoil® DNA Isolation Kit,美国QIAGEN公司,货号12888-100)对青贮后样品中微生物的DNA进行提取,通过NanoDrop ND-1000分光光度计(美国)对提取的DNA纯度和浓度以及DNA质量(1%琼脂糖凝胶电泳)进行检测,提取的DNA放置于一20 °C冰箱进行保存。

1.3.2 荧光定量PCR 采用荧光定量PCR(qPCR)分别定量两个可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)(*intl1*、*intl2*)、8种四环素抗性基因(tetracycline resistance genes, TRGs)(*tetA*、*tetB*、*tetG*、*tetX*、*tetM*、*tetW*、*tetO*、*tetK*)。定量PCR方法参考温馨^[22],引物序列见表1。

1.4 数据处理与amp;分析

使用Microsoft Excel 2019进行基础数据处理,采用IBM SPSS Statistics 25.0的单因素方差分析,检验数据的差异显著性,显著水平设置为 $P < 0.05$,并用不同字母标记。箱线图、条形图和相关性图由OmicShare制作生成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'–3')	片段大小 Clip size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 References
<i>16s</i>	F:AGTTTGATCMTGGCTCAG R:AAGTCGTAACAAGGTAACC	1500	55	[1]
<i>int1</i>	F:GGCTTCGTGATGCCTGCTT R:CATTCCCTGGCCGTGGTTCT	148	55	[1]
<i>int2</i>	F:GTTATTTTATTGCTGGGATTAGGC R:TTTTACGCTGCTGTATGGTGC	164	56	[1]
<i>tetA</i>	F:TTGGCATTCTGCATTCACCTCG R:CCACCCGTTCCACGTTGTT	174	58	[1]
<i>tetB</i>	F:TTCACCGCATAGTCCCTT R:TGCAATAAATCCGAGCAG	189	58	[2]
<i>tetG</i>	F:CAGCTTTCGGATTCTTACGG R:GATTGGTGAGGCTCGTTAGC	134	54	[1]
<i>tetK</i>	F:TCGATAGGAACAGCAGTA R:CAGCAGATCCTACTCCTT	168	58	[4]
<i>tetM</i>	F:GTGGACAAAGGTACAACGAG R:CGGTAAGTTCGTCACACAC	171	55	[1]
<i>tetO</i>	F:AACTTAGGCATTCTGGCTCAC R:TCCCACTGTTCCATATCGTCA	171	60	[1]
<i>tetX</i>	F:CAATAATTGGTGGTGGACCC R:TTCTTACCTTGACATCCCG	131	57	[1]
<i>tetW</i>	F:GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R:GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	61	[1]

2 结果与分析

2.1 象草原料的营养品质特征

象草原料的干物质含量为 36.01% FM, NDF 和 ADF 的含量分别为 86.92% DM、41.23% DM, WSC 的含量为 35.73% DM。象草原料表面附着的微生物数量丰富, 其中乳酸菌、酵母菌、霉菌、大肠杆菌的数量分别为 4.86、4.43、3.44 和 4.32 lg cfu·g⁻¹ FM(表 2)。

2.2 添加乳酸菌对象草青贮发酵品质的影响

青贮 30 d 后, 所有处理组的 pH 均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其中 LC、LB 处理组的 pH 分别为 4.38、4.44, 显著低于其他处理组 ($P < 0.05$)。此外, 微生物中大肠杆菌、酵母菌、霉菌数量低于检测水平 (< 2 lg cfu·g⁻¹ FM)。

与对照组相比, 青贮后 LA、LB、LD 和 LE 处理组的乳酸菌数量显著降低 ($P < 0.05$), LC 与对照组无显著差异 ($P > 0.05$) 且数量略高。各处理组丙酸无明显差异, 丁酸未检出。与对照组相比, 所有处理组的乳酸含量均增加, 其中 LC 处理组显著增加 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 2 象草原料营养成分及其表面微生物

Table 2 Elephant grass raw material nutrients and microorganisms on their surface

项目 Item	含量 Content
干物质 Dry matter (% FM)	36.01±0.97
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, % DM)	86.92±1.84
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, % DM)	41.23±0.73
可溶性碳水化合物 Water-soluble carbohydrate (WSC, % DM)	35.73±1.55
乳酸菌 Lactic acid bacteria (LAB, lg cfu·g ⁻¹ FM)	4.86±0.96
酵母菌 Yeasts (lg cfu·g ⁻¹ FM)	4.43±0.21
霉菌 Moulds (lg cfu·g ⁻¹ FM)	3.44±0.60
大肠杆菌 Coliform bacteria (lg cfu·g ⁻¹ FM)	4.32±0.28

表3 添加乳酸菌后的象草青贮品质以及微生物

Table 3 Silage quality and microbial counts of elephant grass silage after the addition of lactic acid bacteria

项目 Item	处理 Treatment						标准误 SEM	P值 P-value
	CK	LA	LB	LC	LD	LE		
pH	4.77a	4.50b	4.44c	4.38c	4.49b	4.51b	0.029	**
乳酸菌 Lactic acid bacteria (LAB, lg cfu·g ⁻¹ FM)	7.83a	7.28b	7.25b	8.16a	6.94b	7.22b	0.098	**
大肠杆菌 Coliform bacteria (lg cfu·g ⁻¹ FM)	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	ND	NS
酵母菌 Yeasts (lg cfu·g ⁻¹ FM)	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	ND	NS
霉菌 Moulds (lg cfu·g ⁻¹ FM)	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	ND	NS
乳酸 Lactic acid (La, % DM)	1.13b	1.29ab	1.39ab	1.94a	1.71ab	1.33ab	0.103	NS
乙酸 Acetic acid (AA, % DM)	0.36abc	0.28bc	0.25c	0.60a	0.32bc	0.53ab	0.040	*
丙酸 Propionic acid (PA, % DM)	0.06a	0.05a	0.08a	0.13a	0.13a	0.03a	0.014	NS

不同小写字母表示在不同乳酸菌菌液处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicated significant differences among different lactic acid bacteria treatment groups ($P < 0.05$). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ND: 因检测值低于方法检出计量单位下限, 无法计算具体标准误 Standard errors could not be calculated as the measured values were lower than the lower limit of the measurement unit detected by the method; NS: $P > 0.05$. 下同 The same below.

2.3 添加乳酸菌对象草青贮营养成分的影响

与对照组相比, LC、LD、LE处理组的NDF含量显著升高 ($P < 0.05$)。LA、LB、LC、LD处理组的ADF含量均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。此外, 在青贮30 d后, 所有处理组的氨态氮含量均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。除LD处理组比LC组显著增加外, 其余各处理组的WSC含量与LC组间均无显著差异 ($P > 0.05$, 表4)。

表4 添加乳酸菌后的象草营养成分

Table 4 Elephant grass nutrients after the addition of lactic acid bacteria

项目 Item	处理 Treatment						标准误 SEM	P值 P-value
	CK	LA	LB	LC	LD	LE		
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, % DM)	73.56b	73.26b	73.34b	77.05a	77.91a	78.46a	0.443	*
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, % DM)	44.84a	36.61c	40.74b	41.78b	41.66b	43.64a	0.570	**
可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate (WSC, % DM)	8.56ab	8.33ab	8.75ab	7.60b	10.23a	9.47ab	0.277	NS
氨态氮 Ammonia nitrogen (NH ₃ -N)	1.10a	0.40c	0.40c	0.42c	0.65b	0.65b	0.057	**

2.4 象草青贮中ARGs丰度的变化

用不同乳酸菌对象草青贮30 d后, MGEs中 *intl1* 的绝对丰度有显著变化 ($P < 0.05$)。与CK相比, LA、LB、LC和LE处理组的绝对丰度均显著下降 (图1, $P < 0.05$)。

用不同乳酸菌对象草青贮30 d后, TRGs的绝对丰度均有显著下降。与CK相比, 除了LD处理组外, 其他添加不同乳酸菌处理组 *tetA* 的绝对丰度均为显著下降 ($P < 0.05$); LB和LC处理组 *tetB* 的绝对丰度均显著低于CK组 ($P < 0.05$), 其中LC处理组的 *tetB* 绝对丰度最低, 其丰度为 $10^{2.47} \sim 10^{3.35}$ 拷贝数·g⁻¹ DM; 在 *tetG* 和 *tetK* 的检测中, LC和LB处理组分别显著低于CK组; 在 *tetM* 的检测中, LA、LB、LD和

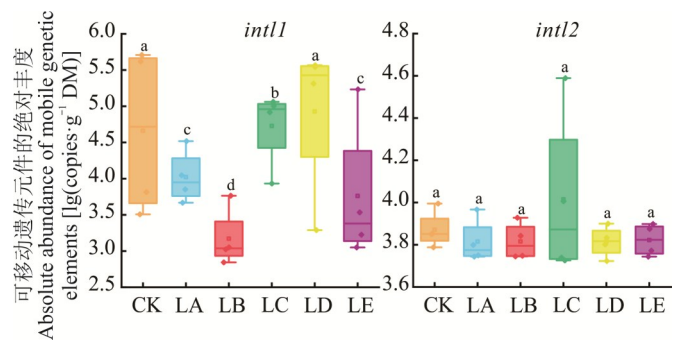


图1 发酵30 d后可移动遗传元件绝对丰度的变化

Fig. 1 Changes in the absolute abundances of mobile genetic elements (MGEs) after 30 days of fermentation

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。The different lowercase letters indicated significant differences among different treatments ($P < 0.05$), the same below.

LE 处理组的绝对丰度均显著低于 CK 组 ($P < 0.05$); 此外, LC 处理组在 *tetO*、*tetW*、*tetX* 的绝对丰度均呈下降趋势, LB 处理组在 *tetW* 的绝对丰度也显著下降 ($P < 0.05$), 为 $10^{1.55} \sim 10^{1.76}$ 拷贝数 $\cdot g^{-1}$ DM (图 2)。

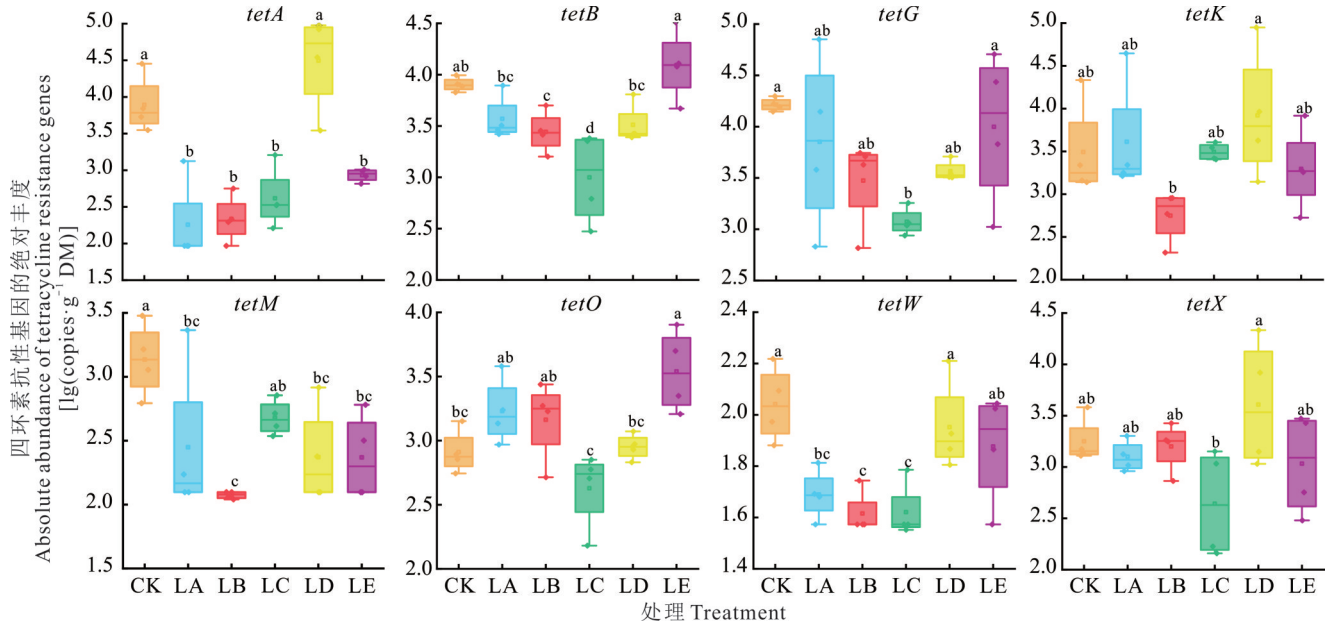


图 2 发酵 30 d 后四环素抗性基因的绝对丰度变化

Fig. 2 Changes in the absolute abundances of tetracycline resistance genes (TRGs) after 30 days of fermentation

2.5 TRGs 与 MGEs 的相关性

TRGs 与 MGEs 之间的 Pearson 相关性结果表明, *tetA*、*tetX*、*tetM*、*tetW* 和 *tetK* 的绝对丰度与 *intl1* 呈极显著的正相关 ($P < 0.01$) 关系, *tetB*、*tetX*、*tetM*、*tetO* 和 *tetK* 与 *intl2* 的绝对丰度呈极显著负相关 ($P < 0.01$) 关系 (表 5)。

3 讨论

3.1 添加乳酸菌对象草青贮营养品质和表面微生物的影响

添加乳酸菌对青贮发酵品质的影响主要体现在通过调控微生物群落动态和代谢路径优化发酵过程。青贮的核心目标是利用厌氧环境促使乳酸菌主导发酵, 快速降低 pH 值以抑制腐败菌和霉菌的活动, 从而减少营养损失并提升饲料稳定性。自然附着的乳酸菌数量或活性不足时, 青贮初期因好氧微生物的增殖导致原料发热、糖分消耗及干物质损失, 而外源添加乳酸菌可加速进入酸化阶段, 缩短发酵停滞期。本试验结果表明, 添加不同乳酸菌均使象草青贮后的 pH 值呈降低趋势。但外源乳酸菌的添加并未普遍提高青贮 30 d 后的乳酸菌数量。与对照组相比, LA、LB、LD 和 LE 处理组的乳酸菌数量反而显著降低 ($P < 0.05$), 仅有 LC 组与对照组无显著差异且数值略高。这一结果与通常认为添加乳酸菌会直接增加青贮中乳酸菌数量的结论不符, 值得深入探讨。这可能是试验添加的特定乳酸菌株在象草青贮环境中竞争力不足, 未能有效定殖或增殖, 甚至可能受到原有微生物区系或发酵产物的抑制; 其次可能是添加的菌株快速消耗可利用底物进行发酵, 导致后期可支持其存活营养物质耗尽, 活菌数下降; 最后有可能是发酵造就的低 pH 环境, 本身对部分乳酸菌株产生抑制作用。LC 处理组能

表 5 四环素抗性基因与可移动遗传元件之间的相关性

Table 5 Correlations between tetracycline resistance genes (TRGs) and mobile genetic elements (MGEs)

基因 Gene	<i>intl1</i>	<i>intl2</i>
<i>tetA</i>	0.556**	-0.080
<i>tetB</i>	0.132	-0.292**
<i>tetG</i>	0.154	-0.047
<i>tetX</i>	0.233**	-0.237**
<i>tetM</i>	0.389**	-0.296**
<i>tetW</i>	0.293**	-0.064
<i>tetO</i>	0.287	-0.164**
<i>tetK</i>	0.403**	-0.108**

**表示在 0.01 级别 (双尾) 相关性显著。 ** indicates a significant correlation at the 0.01 level (two-tailed).

维持较高的乳酸菌数量,可能与其使用的特定菌株或组合更适应象草基质和发酵环境有关。

本试验观察到所有处理组(包括CK)的丁酸均未检测到。结合大肠杆菌、酵母菌和霉菌在所有组中均低于检测限($<2 \lg \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)的结果,这表明了在本试验条件下,青贮发酵成功地建立了良好的厌氧环境,有效抑制了有害微生物的活动,避免了丁酸发酵和蛋白质的严重分解,这是青贮成功的关键标志之一。虽然添加外源乳酸菌进一步降低了pH并提高了乳酸含量,但未检出丁酸主要是整体发酵环境控制得当的结果,而非单一由添加菌所致。pH值可以反映青贮过程中的酸类物质尤其是乳酸的积累情况^[23]。且试验中LA、LB、LC、LD处理组的ADF含量均显著低于对照组($P<0.05$),有助于直接提升象草青贮后有机物质消化率。此外,在青贮30 d后,所有处理组的氨态氮含量均显著低于对照组($P<0.05$)。氨态氮这一指标是评估乳酸菌添加剂效果及青贮工艺优化的重要依据,氨态氮含量的下降有助于显著改善反刍动物对氮的瘤胃沉积效率。

3.2 添加乳酸菌对象草 TRGs 和 MGEs 绝对丰度的影响

作为全球畜牧养殖业应用覆盖率超过75%的基础性药物,四环素类抗生素凭借其广谱抗菌活性与多重生物学效应,持续主导兽用抗生素市场。四环素类抗生素的过度使用导致畜禽肠道菌群中 *tetM*、*tetQ* 等耐药基因丰度提升3~5个数量级,这些基因通过可移动遗传元件向人类致病菌水平转移,致使临床分离株中四环素耐药率突破60%。同时,剩余未被代谢的四环素原型经粪肥进入农田生态系统,在土壤-作物系统中形成持续180 d以上的生物活性残留。本研究中的不同乳酸菌对象草青贮30 d后 TRGs 和 MGEs 绝对丰度呈抑制作用。有研究认为添加乳酸菌后青贮的象草,可能是通过酸化胁迫与微生物互作重塑耐药基因的生态位,例如乳酸菌主导的快速发酵有利于通过质子动力效应抑制梭菌、肠杆菌等条件致病菌的增殖,从而降低 TRGs 与 MGEs 的丰度。例如 Zhang 等^[10]的研究发现,青贮发酵参数,包括 pH 值、乳酸、乙酸、氨态氮含量和大肠杆菌计数,也影响了 ARGs 的丰富性。因此,本研究中添加不同乳酸菌,LA、LB、LC 等处理组有助于改善象草青贮后的 TRGs 与 MGEs 丰度变化。

3.3 ARGs 和 MGEs 之间相关性的分析

细菌的抗生素耐药性主要来自自然途径与后天途径两种。自然环境下,外源 ARGs 可能通过水平基因转移传播途径进入空气、水、食物,最终危害人类健康^[24]。MGEs 引发的水平基因转移与 ARGs 丰度的变化密切相关,促进水平基因转移的因素,也会同时促进 ARGs 的传播^[25]。且水平基因转移是抗性基因形成和传播的主要驱动力之一,而质粒、转座子和整合子等组成的 MGEs 能够促使抗生素抗性基因在微生物反应时发生水平基因转移^[26]。有研究证明,整合子 *int11* 是牛粪堆肥过程中 ARGs 变异的主要驱动因子之一^[26]。在畜牧业实际生产中,抗生素常被用作青贮添加剂处理饲草。在本研究中,添加不同乳酸菌后,青贮象草的 TRGs 绝对丰度显著下降($P<0.05$),可能是乳酸菌的数量增加有助于减少 TRGs 宿主生活空间,TRGs 的主要载体有害细菌与病原菌在酸性环境中受到抑制,这一结果与 Zhang 等^[10]的研究结果相似。饲草在青贮过程中也易于将 TRGs 载体留于青贮场地与容器,进一步污染饲草。最终可能导致抗生素残留和抗性基因在土壤、水体等介质中扩散,进而对生态系统和人类健康构成潜在威胁。根据表5可得,*tetA*、*tetX*、*tetM*、*tetW*、*tetK* 与 *int11* 呈显著正相关关系,添加不同乳酸菌有助于降低 *int11* 的丰度,这可能是通过抑制 MGEs 来减少对 TRGs 的水平基因转移发生,使 TRGs 的绝对丰度呈显著下降($P<0.05$)。本研究发现,不同处理组中,LC 处理组青贮后 *tetA*、*tetB*、*tetG*、*tetO*、*tetW*、*tetX* 这6种 TRGs 绝对丰度显著下降($P<0.05$),LB 处理组青贮后 *tetA*、*tetB*、*tetM*、*tetW* 这4种 TRGs 绝对丰度显著下降($P<0.05$),推断出添加宜春乳酪杆菌和植物乳杆菌能有效降低青贮后的 TRGs。

综上所述,推测添加不同的乳酸菌有助于抑制 MGEs 对 TRGs 的转移效果,说明添加乳酸菌可以降低青贮过程中产生的 TRGs。

4 结论

象草青贮饲料中 TRGs 种类丰富,且 MGEs 会通过不同途径影响 TRGs 的绝对丰度。使用不同的乳酸菌对象草青贮饲料进行处理,显著改良了青贮后的象草品质与降低了 TRGs 的绝对丰度,有助于减少 TRGs 对饲草的

污染。本研究结果表明,添加宜春乳杆菌或植物乳杆菌是提升象草青贮饲料品质、降低四环素抗性基因污染的有效策略,且使用宜春乳酪杆菌和植物乳杆菌处理后 TRGs 的绝对丰度变化更显著($P < 0.05$)。

参考文献 References:

- [1] Zhu Z W, Wang S F, Zhou M X. Analysis of factors affecting feed quality in feed production management. *Feed Research*, 2019, 42(12): 118–121.
朱中伟,汪善锋,周明夏. 饲料生产管理中影响饲料品质因素的分析. *饲料研究*, 2019, 42(12): 118–121.
- [2] Wang C X. Research progress of silage production technology. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2024, 423(2): 72–75.
王春晓. 青贮饲料制作技术研究进展. *现代畜牧兽医*, 2024, 423(2): 72–75.
- [3] 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.
- [4] Tao S, Noriko O, Masataka S, *et al.* Fermentation quality of forage oat (*Avena sativa* L.) silages treated with pre-fermented juices, sorbic acid, glucose and encapsulated-glucose. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2003, 47(2): 341–349.
- [5] Shao T, Zhang L, Shimojo M, *et al.* Fermentation quality of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) silages treated with encapsulated-glucose, glucose, sorbic acid and pre-fermented juices. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2007, 20(20): 1699–1704.
- [6] Shao T, Ohba N, Shimojo M, *et al.* Effects of adding glucose, sorbic acid and pre-fermented juices on the fermentation quality of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) silages. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(6): 808–813.
- [7] Wilkinson J L, Boxall A B A, Kolpin D W, *et al.* Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(8): e2113947119.
- [8] Peng Y, Peiyan D, Yina Z, *et al.* Effect of pH on the mitigation of extracellular/intracellular antibiotic resistance genes and antibiotic resistance pathogenic bacteria during anaerobic fermentation of swine manure. *Bioresource Technology*, 2023, 373(5): 128706.
- [9] Lin H, Sun W C, Yu Q G, *et al.* Acidic conditions enhance the removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance determinants in swine manure. *Environmental Pollution*, 2020, 263(Part A): 14439.
- [10] Zhang X, Dong Z T, Usman S, *et al.* Metagenomics insights into the effects of lactic acid bacteria inoculation on the biological reduction of antibiotic resistance genes in alfalfa silage. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130287.
- [11] Zhong S. The effects of layer manure composting on tetracycline resistance genes under doxycycline stress. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019.
钟珊. 强力霉素胁迫下蛋鸡粪堆肥对四环素类抗生素抗性基因的影响. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [12] Sreejith S, Shamna S, Pratyush P R, *et al.* Rapid detection of mobile resistance genes *tetA* and *tetB* from metaplasmid isolated from healthy broiler feces. *Microbial Pathogenesis*, 2022(166): 105504.
- [13] Jang H M, Kim B Y, Choi S, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture. South Korea. *Environmental Pollution*, 2018, 233: 1049–1057.
- [14] Lim T K, Hanifah A Y, Yusof M, *et al.* *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2012, 30(2): 203–207.
- [15] Wang C, Wang Y, Zhou W, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* (LP) and moisture on feed quality and tannin content of *Moringa oleifera* leaf silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(6): 109–118.
王成,王益,周玮,等. 植物乳杆菌和含水量对辣木叶青贮品质和单宁含量的影响. *草业学报*, 2019, 28(6): 109–118.
- [16] Shu S M, Yang C H, Tang Z S, *et al.* Effects of different moisture contents with previously fermented juice on the quality of whipgrass (*Hemarthria compressa*) silage. *Grass-Feeding Livestock*, 2011, 153(4): 41–43.
舒思敏,杨春华,唐智松,等. 添加绿汁发酵液对不同含水量扁穗牛鞭草青贮饲料品质的影响. *草食家畜*, 2011, 153(4): 41–43.
- [17] Bolsen K K, Lin C, Brent B E, *et al.* Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa

- and corn silage. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75(11): 3066–3083.
- [18] Xu Q F, Yu Z, Han J G, *et al.* Determining organic acid in alfalfa silage by HPLC. *Grassland and Turf*, 2007(2): 63–65, 67.
许庆方, 玉柱, 韩建国, 等. 高效液相色谱法测定紫花苜蓿青贮中的有机酸. *草原与草坪*, 2007(2): 63–65, 67.
- [19] Chen X Z, Lin P D, Yue W, *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.
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.
- [20] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A, *et al.* Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [21] 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.
- [22] Wen X. Screening of doxycycline-degrading bacteria and study on their drug resistance gene content. Guangzhou: South China Agricultural University, 2015.
温馨. 强力霉素降解菌的筛选及其耐药基因含量研究. 广州: 华南农业大学, 2015.
- [23] 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.
- [24] Aslam B, Wang W, Arshad M I, *et al.* Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 2018(11): 1645.
- [25] Bai J, Ding Z T, Su R, *et al.* Storage temperature is more effective than lactic acid bacteria inoculations in manipulating fermentation and bacterial community diversity, co-occurrence and functionality of the whole-plant corn silage. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0010122.
- [26] Qian X, Sun W, Gu J, *et al.* Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure. *Journal of Hazardous Materials*, 2016(315): 61–69.