

DOI:10.11686/cyxb2025289

http://cyxb.magtech.com.cn

田吉鹏, 王欣, Nazar Mudasir, 等. 青贮前后水稻秸秆非结构性碳水化合物的变化及添加剂对发酵和微生物群落结构的影响. 草业学报, 2026, 35(6): 131—144.

TIAN Ji-peng, WANG Xin, NAZAR Mudasir, *et al.* Changes in non-structural carbohydrates of rice straw between before and after ensiling and additive effects on ensilage fermentation and microbial community structure. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(6): 131—144.

青贮前后水稻秸秆非结构性碳水化合物的变化 及添加剂对发酵和微生物群落结构的影响

田吉鹏^{1,2}, 王欣^{1,2}, Nazar Mudasir^{1,2}, 刘蓓一^{1,2*}, 王思然^{1,2}, 丁成龙^{1,2*}, 程云辉^{1,2}, 李捷³

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2. 农业农村部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014; 3. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

摘要:为研究水稻秸秆青贮前后非结构性碳水化合物(NSC)组分的变化及不同添加剂对于水稻秸秆青贮发酵品质、营养品质、细菌和真菌多样性、霉菌和霉菌毒素污染情况的影响,设置对照组(CK),乳酸菌组(HLAB,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌复合添加)、丙酸钙组(PACA)和复合添加组(HLAB_PACA),每个处理3个重复,其中乳酸菌和丙酸钙的添加量分别为鲜草的 5×10^5 CFU·g⁻¹和4 g·kg⁻¹。在经过90 d的发酵后,水稻秸秆NSC中的葡萄糖、果糖和淀粉均显著下降($P < 0.05$)。添加剂的使用能够部分提升残余葡萄糖含量($P < 0.05$)。HLAB、PACA以及HLAB_PACA显著降低了水稻秸秆青贮饲料的pH、乙酸、丁酸和氨态氮含量($P < 0.05$),提升了乳酸含量($P < 0.05$),显著降低了水稻秸秆中的NDF和ADF含量($P < 0.05$)。丙酸钙(PACA和HLAB_PACA)的使用提升了水稻秸秆细菌群落的Ace指数和Chao1指数($P < 0.05$),乳酸菌的添加(HLAB和HLAB_PACA)将乳杆菌科由自然发酵的联合乳杆菌属、乳植杆菌属和乳酪杆菌属的8种ZOTU转变成以乳酪杆菌属的ZOTU1和ZOTU318为主的细菌群落。所有添加剂的使用都降低了梭菌属的相对丰度。HLAB_PACA与HLAB和PACA相比真菌群落的香农指数显著降低而辛普森指数显著上升($P < 0.05$)。所有添加剂的使用增加了曲霉科真菌的相对丰度并且增加了霉菌数量($P < 0.05$),但是黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮等霉菌毒素含量极低且并没有随着添加剂的使用而明显增加。因此,乳酸菌及丙酸钙添加剂的使用对于改善水稻秸秆青贮饲料NSC结构、发酵品质和微生物群落结构具有重要作用,这为水稻秸秆青贮生产实践提供了理论支撑。

关键词:非结构性碳水化合物;添加剂;水稻秸秆青贮;微生物群落;霉菌毒素

Changes in non-structural carbohydrates of rice straw between before and after ensiling and additive effects on ensilage fermentation and microbial community structure

TIAN Ji-peng^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, NAZAR Mudasir^{1,2}, LIU Bei-yi^{1,2*}, WANG Si-ran^{1,2}, DING Cheng-long^{1,2*}, CHENG Yun-hui^{1,2}, LI Jie³

1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Vocational College Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China

Abstract: Modern breeding techniques have developed rice varieties with straw rich in non-structural carbohydrates (NSC), including glucose, fructose, sucrose, and starch. However, in the high temperature and humidity

收稿日期:2025-07-09;改回日期:2025-09-25

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(BK20220747)和国家自然科学基金青年基金(32201479)资助。

作者简介:田吉鹏(1987—),男,山东烟台人,副研究员,博士。E-mail: tianjipeng2231@jaas.ac.cn

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

conditions of southern China, such straw decomposes rapidly, leading to significant loss of available sugars. Ensiling offers a solution by converting NSC into organic acids. Nevertheless, direct ensiling of rice straw proves ineffective due to dominant *Clostridium* fermentation. This experiment investigated the changes in NSC of rice straw between before and after ensiling and evaluated the impacts of additives on fermentation quality, nutritive value, microbial community composition and mycotoxin load after 90 d of ensiling. Four treatments were used in this experiment: 1) Control group (CK); 2) Lactic acid bacteria inoculants mixed with *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* (HLAB); 3) Calcium propionate (PACA); 4) Mixture of two additives (HLAB_PACA). Three replicates per treatment. The addition rates of HLAB and PACA groups were 5×10^5 CFU·g⁻¹ and 4 g·kg⁻¹ of fresh materials, respectively. After 90 days of fermentation, all groups exhibited significant reductions in glucose, fructose, and starch ($P < 0.05$). HLAB, PACA and HLAB_PACA groups preserved higher ($P < 0.05$) residual glucose levels than the control group. These three additive groups also had significantly lowered pH, acetic acid, butyric acid, and ammonia nitrogen ($P < 0.05$), with increased lactic acid production ($P < 0.05$). Neutral detergent fiber and acid detergent fiber contents were notably decreased by additives ($P < 0.05$). PACA and HLAB_PACA groups had increased bacterial community diversity as measured by Ace and Chao1 indices ($P < 0.05$). The HLAB and HLAB_PACA groups comprised natural fermentative lactic acid bacteria, initially composed of 8 zero-radius operational taxonomic units (ZOTU) belonging to *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* and *Lacticaseibacillus*, which evolved into a *Lacticaseibacillus*-dominant bacterial community (ZOTU1/ZOTU318). All additives suppressed the relative abundance of *Clostridium*. Fungal diversity metrics showed elevated Simpson and reduced Shannon indices ($P < 0.05$) in HLAB_PACA group versus HLAB and PACA groups. Although the use of additives significantly increased the relative abundance of Aspergillaceae and total mould counts ($P < 0.05$) compared to the CK, it did not cause a significant increase in mycotoxin levels, such as aflatoxin and zearalenone, which remained extremely low. Therefore, the use of lactic acid bacteria and calcium propionate additives plays an important role in improving the NSC structure, fermentation quality, and microbial community structure of rice straw silage. These data provide scientific information relevant to the efficient production of rice straw silage.

Key words: non-structural carbohydrates; additive; rice straw silage; microbial community; mycotoxin

水稻(*Oryza sativa*)是我国南方地区主要农作物,每年产生大量水稻秸秆。在过去,水稻秸秆大部分以还田为主,只有20%左右用作秸秆饲料饲喂肉牛、肉羊等。随着国际局势变化以及反刍动物产业发展的需求,对于非粮粗饲料需求越来越大。水稻秸秆本身含有丰富的粗纤维,且在南方农区产量极大,价格低廉^[1],非常适合供应给养殖场用作粗饲料以应对优质粗饲料短缺以及行业竞争和国际市场变化导致的行业寒冬。我国南方地区降水较多,水稻秸秆收获后难以晾晒成干草,且晾晒非常容易造成养分的快速流失。将水稻秸秆粉碎后制作成青贮饲料有助于释放水稻秸秆中的非结构性碳水化合物(non-structural carbohydrate, NSC)并转化成乳酸等有机酸,提升纤维消化率,提升水稻秸秆营养价值和附加值。

饲草NSC主要包括葡萄糖和果糖等单糖、蔗糖等寡糖和淀粉等多糖,其中单糖和寡糖等可溶性糖类物质是乳酸菌厌氧发酵的主要底物^[2],发酵原料的可溶性糖类物质含量通常应该高于60 g·kg⁻¹ DM^[3]。研究表明^[4],一些品种收割后的水稻茎秆、叶片和叶鞘中含有的可溶性糖含量高于60 g·kg⁻¹ DM。这说明水稻秸秆中具备乳酸菌厌氧发酵所需的发酵底物。但是在实际生产中,水稻秸秆直接青贮品质较差,丁酸含量高,还会出现霉变等现象^[5]。除了稻秆本身结构性碳水化合物含量较高以外,水稻秸秆中的NSC组成也是影响厌氧发酵效果的重要因素。陈鑫珠等^[6]的研究表明,附着乳酸菌对饲草碳源具有明显的选择性,会优先消耗蔗糖和葡萄糖。这说明有必要对水稻秸秆中的NSC组成进行进一步分析。

南方地区植物附着乳酸菌的数量较少也会影响水稻秸秆青贮的发酵效果。传统上研究者主要利用平板培养法来评估青贮乳酸菌的数量,工作量大且对于实际发挥作用的乳酸菌很难进一步进行分析^[7]。近年来随着16S和ITS rRNA二代基因测序技术、三代全长测序以及宏基因组技术的成熟以及在青贮饲料发酵样品检测中的普遍应用,使得人们对于青贮饲料中的微生物群落有了更深入的认识,并识别出了更多的乳酸菌属种参与厌氧发酵^[8]。但是这些微生物与青贮NSC的相互作用仍少有研究。因此,评估水稻秸秆青贮前后NSC的变化及与微生物群落的相互作用有助于更精准地进行水稻秸秆质量提升和添加剂选择。

本研究通过对青贮前后水稻秸秆NSC、有机酸、醇类、铵态氮和营养成分的分析及不同添加剂(复合乳酸菌添加剂及有机酸盐)对水稻秸秆微生物群落的影响,探讨青贮发酵中添加剂、NSC和微生物群落之间的相互作用,更精确地评估添加剂对水稻秸秆品质的提升作用及潜在的安全风险,为秸秆类青贮饲料的加工和利用以及适合添加剂的筛选提供理论依据和技术依托。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2023年开展,试验材料来自江苏省南京市江苏省农业科学院水稻试验田,为杂交水稻品种。复合乳酸菌添加剂由稻秸自然发酵青贮中筛选的具有高产酸能力的乳酸菌复配而成,包含植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)和副干酪乳杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*),添加比例为1:1,总添加量为在水稻秸秆基础上添加 5×10^5 CFU·g⁻¹, -20℃保存,使用前加入少量MRS液体培养基活化1 h后使用。使用的有机酸盐为丙酸钙(4075-81-4,上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 试验设计

使用单因素完全随机试验设计,共4个试验处理,分别是对照组(CK,蒸馏水处理),复合乳酸菌组(HLAB,添加复合乳酸菌,添加量为 5×10^5 CFU·g⁻¹),丙酸钙组(PACA,添加丙酸钙,添加量为鲜样的0.4%),乳酸菌+丙酸钙组(HLAB_PACA,同时添加复合乳酸菌和丙酸钙,添加量与其他组保持一致)。每次处理3个重复。

水稻收获脱粒后立即用铡刀将约4 kg水稻秸秆切成2~3 cm的小段后混合均匀并用四分法分成12份,每份等量约300 g,使用喷壶和等量蒸馏水(20 mL·kg⁻¹鲜样)溶解各添加剂后均匀喷洒进每份水稻秸秆中并混合均匀,使用35 cm×25 cm的青贮袋抽真空后密封并室温贮存90 d。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 青贮开袋后立即进行样品采集,混合均匀后在托盘中摊开,选取5个点平均采集,每次取20.00 g,同样的方法进行3次,共采集3份样品,称取200 g左右装入牛皮纸袋中用于营养成分的检测。

1.3.2 糖、醇和有机酸的测定 取20.00 g样品加入180 mL蒸馏水后放入4℃冰箱中120 r·min⁻¹振荡浸提24 h,然后过滤得到浸提液,使用pH计[FE20,LE438玻璃电极,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]测定浸提液的pH及铵态氮含量。浸提液振荡后用无菌注射器抽取约3 mL然后使用一次性滤器过滤进液相小瓶中,使用高效液相色谱法进行可溶性糖、醇类物质和有机酸的检测,具体色谱条件如下:高效液相色谱仪(安捷伦1260液相色谱仪配备示差折光检测器G1362ARID,安捷伦科技有限公司,美国)。色谱柱:Shodex SHG保护柱+SH1011糖有机酸分析色谱柱(8.0 mm×300 mm,力森诺科科学仪器有限公司);进样体积5 μL;流动相:3 mmol·L⁻¹ HClO₄;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:20℃;检测器温度:30℃;运行时间20 min。检测指标包括乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、1,2-丙二醇、乙醇、蔗糖、葡萄糖和果糖。

1.3.3 霉菌计数和霉菌毒素测定 取20.00 g样品加入180 mL灭菌生理盐水后放入室温120 r·min⁻¹振荡2 h后在超净工作台中分别稀释成10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶共6个梯度后使用平板倾注法^[9]进行微生物计数,根据经验选取最适合的3个梯度使用孟加拉红培养基(北京陆桥技术股份有限公司)对霉菌进行培养,霉菌在28℃恒温培养3 d后开始观察,最长保持7 d对霉菌数量进行汇总计数。使用60%甲醇振荡(160 r·min⁻¹)提取水稻秸秆青贮饲料,4000 r·min⁻¹离心后使用华安麦科的黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮检测试剂盒及酶标仪分别对黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮进行检测。

1.3.4 微生物多样性分析 取 20.00 g 样品加入 80 mL 灭菌蒸馏水后 120 r·min⁻¹ 室温振荡 2 h, 使用灭菌纱布过滤水稻秸秆后, 将提取液置于 4 °C 低温高速离心机 12000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后弃去上清, 收集微生物菌体并使用干冰邮寄至上海美吉生物有限公司进行高通量测序。使用 E. Z. N. A.® 土壤 DNA 提取试剂盒对总 DNA 进行提取, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 的质量, 使用 NanoDrop 2000 检测 DNA 浓度和纯度, 16S 使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 DNA 扩增, ITS 使用 ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') 和 ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 引物进行 DNA 扩增, 使用 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序, 测序结果使用 Unoise3 命令执行去噪, 得到零半径操作分类单元 (zero-radius operational taxonomic unit, ZOTU), 细菌和真菌分别使用 silva138.2/16s_bacteria 和 unite10.0/its_fungi 数据库进行比对注释, 后续使用美吉云平台对 α 多样性、 β 多样性和微生物组成进行分析。

1.3.5 营养品质 约 200 g 样品装入牛皮纸袋中 105 °C 杀青 30 min, 然后 65 °C 烘干至恒重, 根据重量变化计算干物质含量 (DM)。烘干后样品使用带筛网的粉碎机 (1 mm) 进一步粉碎后保存于自封袋中, 后续用于对粗蛋白质 (CP)、中性洗涤纤维 (NDF)、酸性洗涤纤维 (ADF) 和淀粉含量进行检测^[9]。NSC 含量由两种单糖、蔗糖和淀粉计算得到。

1.4 数据分析

数据整理和统计分析采用 Excel 2016 和 SPSS 20.0 进行, 采用单因素 ANOVA 进行方差分析, 使用 Tukey 法进行多重比较。数据采用平均值 \pm 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 青贮前后水稻秸秆中 NSC 组成和含量变化

青贮前后水稻秸秆的 NSC 组成和含量除了蔗糖外都发生了显著变化 ($P < 0.01$, 表 1)。水稻秸秆原料中蔗糖含量很少, 仅 3.35 g·kg⁻¹ DM, 明显少于葡萄糖 (24.7 g·kg⁻¹ DM)、果糖 (31.8 g·kg⁻¹ DM) 和淀粉 (88.9 g·kg⁻¹ DM)。青贮后蔗糖含量有所降低, 但是没有显著差异 ($P > 0.05$)。与水稻秸秆原料相比, 青贮后所有处理组葡萄糖含量都显著减少 ($P < 0.05$), 减少最多的是 CK 组, 减少最少的是 PACA 组。水稻秸秆中的果糖含量在青贮后也显著下降 ($P < 0.05$), 但是青贮后各处理组之间则无显著差异 ($P > 0.05$)。除了 HLAB 外, 水稻秸秆中的淀粉含量在青贮后均显著下降 ($P < 0.05$)。NSC 含量在青贮后显著下降 ($P < 0.05$), 但是青贮后所有处理间无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 青贮前后水稻秸秆中非结构性碳水化合物组成的变化

Table 1 Changes in non-structural carbohydrate composition in rice straw before and after ensiling (g·kg⁻¹ DM)

| 项目 Item | 处理组 Treatment group | | | | | 标准误 SEM | 显著性 P-value |
|---------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|----------------|
| | Y | CK | HLAB | PACA | HLAB_PACA | | |
| 蔗糖 Sucrose | 3.35 \pm 1.290a | 1.16 \pm 0.338a | 1.05 \pm 0.061a | 0.91 \pm 0.037a | 1.14 \pm 0.121a | 0.33 | NS |
| 葡萄糖 Glucose | 24.70 \pm 1.690a | 1.52 \pm 0.425d | 4.80 \pm 0.438cd | 10.70 \pm 0.901b | 6.65 \pm 0.681c | 2.19 | *** |
| 果糖 Fructose | 31.80 \pm 1.750a | 4.04 \pm 0.196b | 3.87 \pm 0.190b | 5.24 \pm 0.577b | 5.08 \pm 0.372b | 2.94 | *** |
| 淀粉 Starch | 88.9 \pm 7.62a | 51.8 \pm 8.76b | 73.9 \pm 8.44ab | 48.2 \pm 4.83b | 50.3 \pm 3.28b | 5.03 | ** |
| 非结构性碳水化合物 NSC | 149.0 \pm 10.40a | 58.6 \pm 8.51b | 83.6 \pm 8.10b | 65.1 \pm 4.85b | 63.2 \pm 4.11b | 9.41 | *** |

DM, 干物质 Dry matter; Y, 水稻秸秆原料 Rice straw raw materials; CK, 对照组水稻秸秆青贮 Control silage of rice straw; HLAB, 复合乳酸菌添加剂组水稻秸秆青贮 Rice straw silage treated with mixed lactic acid bacteria; PACA, 丙酸钙组水稻秸秆青贮 Rice straw treated with calcium propionate; HLAB_PACA, 复合乳酸菌和丙酸钙混合组水稻秸秆青贮 Rice straw silage treated with calcium propionate and mixed lactic acid bacteria; NSC, Non-structural carbohydrate; SEM, Standard error of the mean; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; NS, $P > 0.05$; 同行不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercase letters in the same row mean significant differences among different treatments at $P < 0.05$. 下同 The same below.

2.2 青贮 90 d 后添加剂对水稻秸秆发酵品质的影响

添加剂的使用显著影响了水稻秸秆青贮后的 pH、有机酸和氨态氮含量 ($P < 0.01$, 表 2)。CK 组的 pH 为 4.96, 而所有处理组的 pH 都在 4.10 以下, 以 HLAB_PACA 组的 pH 最低, 降低至 4.01。乳酸含量以 CK 组为最低, 仅有 $7.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$, 添加剂的使用显著提升了乳酸含量 ($P < 0.05$), HLAB_PACA 组具有最高的乳酸含量。所有添加剂的使用都显著降低了乙酸含量 ($P < 0.05$), 以 HLAB 组的乙酸含量最低。自然发酵的 CK 组中检出少量丙酸 ($0.185 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$), 但是在 HLAB 中未检出丙酸。PACA 组的丙酸含量最高 ($P < 0.05$)。CK 组含有很高含量的丁酸 ($21.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$), 添加剂的使用显著降低了丁酸含量 ($P < 0.05$), 其中使用了丙酸钙的 HLAB_PACA 和 PACA 组均未检出丁酸。CK 组氨态氮含量为 $208 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TN}$, 所有添加剂处理都显著降低了氨态氮含量 ($P < 0.05$), 且所有添加剂都能将氨态氮含量降低到 $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TN}$ 以下。只有 HLAB 组具有少量 1,2-丙二醇, 其他处理组都未检出。所有处理组都未检出异丁酸。HLAB_PACA 和 PACA 组中丙酸钙的使用降低了乙醇的含量, 但是所有处理组之间均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 水稻秸秆 90 d 青贮后添加剂对发酵品质的影响

Table 2 Effects of additives on fermentation quality in rice straw after 90 d of ensiling

| 项目 Item | 处理组 Treatment group | | | | 标准误 SEM | 显著性 P-value |
|--|---------------------|---------------|---------------|--------------|------------|----------------|
| | CK | HLAB | PACA | HLAB_PACA | | |
| pH | 4.96±0.0260a | 4.04±0.0029bc | 4.07±0.0058b | 4.01±0.0058c | 0.12 | *** |
| 乳酸 Lactic acid ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 7.66±0.78c | 44.20±2.19b | 61.70±1.79a | 65.90±2.94a | 6.98 | *** |
| 乙酸 Acetic acid ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 6.10±0.635a | 2.13±0.433c | 3.63±0.267bc | 4.07±0.088b | 0.46 | ** |
| 丙酸 Propionic acid ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 0.185±0.185b | ND | 10.300±0.514a | 8.170±1.190a | 1.43 | *** |
| 丁酸 Butyric acid ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 21.80±1.20a | 3.99±2.31b | ND | ND | 2.77 | *** |
| 氨态氮 Ammonia Nitrogen ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TN}$) | 208.0±9.020a | 51.5±0.373b | 55.1±1.540b | 54.3±0.472b | 20.30 | *** |
| 1,2-丙二醇 1,2-Propanediol ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | ND | 0.358±0.0348 | ND | ND | 0.05 | NS |
| 乙醇 Ethanol ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 18.0±4.22a | 11.8±1.75a | 8.22±0.82a | 8.01±1.39a | 1.59 | NS |

ND, 未检出 Not detected.

2.3 青贮 90 d 后水稻秸秆中添加剂对蛋白和纤维组分的影响

表 3 表明水稻秸秆青贮 90 d 后水稻秸秆干物质和纤维组分都受到添加剂的显著影响 ($P < 0.01$), 而所有处理组的粗蛋白含量都没有显著差异 ($P > 0.05$)。CK 组的干物质含量最低, 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量最高, 所有添加剂的使用都显著增加了干物质含量 ($P < 0.05$), 显著降低了中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量 ($P < 0.05$)。相比于 CK 和 HLAB 组, HLAB_PACA 和 PACA 组具有更高的干物质含量以及更低的中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量。

表 3 水稻秸秆 90 d 青贮后添加剂对蛋白和纤维组分的影响

Table 3 Effects of additives on protein and fiber composition in rice straw after 90 d of ensiling

| 项目 Item | 处理组 Treatment group | | | | 标准误 SEM | 显著性 P-value |
|---|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|----------------|
| | CK | HLAB | PACA | HLAB_PACA | | |
| 干物质 Dry matter ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 295±3.23c | 311±0.33b | 327±1.84a | 328±3.74a | 4.18 | *** |
| 粗蛋白 Crude protein ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 69.5±0.159a | 71.5±0.506a | 72.2±0.820a | 70.4±0.727a | 0.40 | NS |
| 中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 636±5.04a | 601±4.54b | 561±1.33c | 571±5.87c | 9.06 | *** |
| 酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$) | 407±0.77a | 372±3.30b | 338±5.48c | 348±4.86c | 8.20 | *** |

2.4 青贮90 d后水稻秸秆中添加剂对细菌和真菌群落的稀释曲线和 α 多样性的影响

添加剂对水稻秸秆青贮饲料中细菌和真菌群落的稀释曲线和 α 多样性变化的影响见图1和表4。针对不同处理组在细菌和真菌多样性分析过程中都根据最少序列数进行了抽平。抽平后的细菌(图1a)和真菌(图1c)测序获得的Sobs指数随着随机抽取的序列数的增加而逐渐趋于平缓,细菌(图1b)和真菌(图1d)群落的香农指数更早达到了平缓状态。所有处理组的细菌和真菌测序的覆盖度都超过了99.8%(表4)。虽然细菌群落中测序获得的ZOTU数目、香农指数、辛普森指数不受添加剂处理的影响($P>0.05$),但是PACA和HLAB_PACA处理组相比CK组具有更高的Ace指数和Chao1指数($P<0.05$)。相反的,真菌群落Ace指数和Chao1指数不受添加剂的影响,而HLAB和PACA处理相比CK和HLAB_PACA处理组具有更高的香农指数($P<0.05$)和更低的辛普森指数($P<0.05$)。

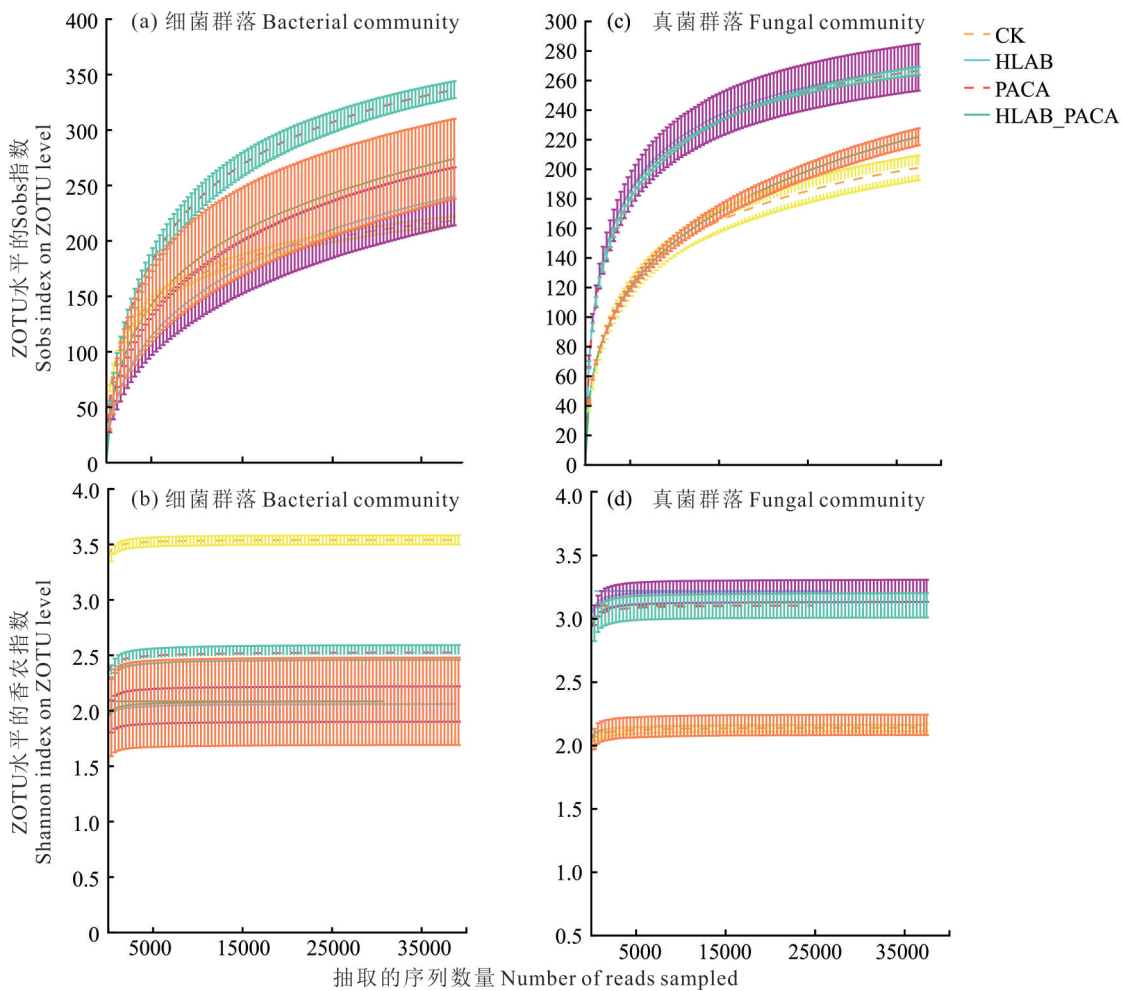


图1 水稻秸秆青贮中细菌群落和真菌群落的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of bacterial community and fungal community in rice straw silage

ZOTU, 零半径操作分类单元 Zero-radius operational taxonomic unit. 下同 The same below.

2.5 青贮90 d后水稻秸秆中添加剂对细菌和真菌群落的 β 多样性和物种集合的影响

添加剂对水稻秸秆青贮饲料中细菌和真菌群落的 β 多样性和物种集合的影响见图2。利用布雷-柯蒂斯距离(Bray-Curtis distance)对细菌群落和真菌群落进行数据降维,以研究不同添加剂处理组的差异性。在细菌群落(图2a)中PC1和PC2轴对结果的解释度分别为44.98%和36.44%,在图中两个维度可以将CK、HLAB和PACA组明确区分开,HLAB_PACA组内差异较大并分别与HLAB和PACA具有很强的相似性。图2b给出了细菌群落中各处理组ZOTU之间的集合,可以看出4个处理组之间共享的ZOTU最多,达到了194个,其次是3个

表 4 水稻秸秆 90 d 青贮后添加剂对细菌和真菌群落的 α 多样性的影响

Table 4 Effects of additives on the α diversity of bacterial and fungal community in rice straw after 90 d of ensiling

| 类别 Category | 项目 Item | 处理组 Treatment group | | | | 标准误 SEM | 显著性 P-value |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------|------------|----------------|
| | | CK | HLAB | PACA | HLAB_PACA | | |
| 细菌群落 Bacterial community | Sobs 指数 Sobs index | 218±6.5a | 240±45.3a | 336±13.3a | 274±62.4a | 21.500 | NS |
| | 香农指数 Shannon index | 3.54±0.073a | 2.06±0.276a | 2.52±0.116a | 2.08±0.683a | 0.241 | NS |
| | 辛普森指数 Simpson index | 0.061±0.006a | 0.267±0.039a | 0.217±0.023a | 0.326±0.116a | 0.040 | NS |
| | Ace 指数 Ace index | 250±8.31c | 312±38.90bc | 379±5.66ab | 439±8.92a | 23.100 | ** |
| | Chao1 指数 Chao1 index | 247±9.5b | 302±38.0ab | 386±10.4a | 363±34.8a | 19.900 | * |
| | 覆盖度 Coverage (%) | 99.91±0.0045a | 99.83±0.0145ab | 99.84±0.0153ab | 99.81±0.0371b | 0.015 | * |
| 真菌群落 Fungal community | Sobs 指数 Sobs index | 201±14.70a | 269±27.50a | 266±4.84a | 222±9.96a | 11.300 | * |
| | 香农指数 Shannon index | 2.14±0.048b | 3.22±0.151a | 3.10±0.167a | 2.16±0.139b | 0.163 | ** |
| | 辛普森指数 Simpson index | 0.279±0.0246a | 0.110±0.0104b | 0.138±0.0300b | 0.300±0.0405a | 0.028 | ** |
| | Ace 指数 Ace index | 227±14.9a | 288±26.0a | 287±12.7a | 279±9.8a | 10.500 | NS |
| | Chao1 指数 Chao1 index | 234±13.4a | 296±21.3a | 291±18.0a | 273±14.4a | 10.300 | NS |
| | 覆盖度 Coverage (%) | 99.90±0.0103ab | 99.91±0.0067a | 99.91±0.0227a | 99.85±0.0062b | 0.010 | * |

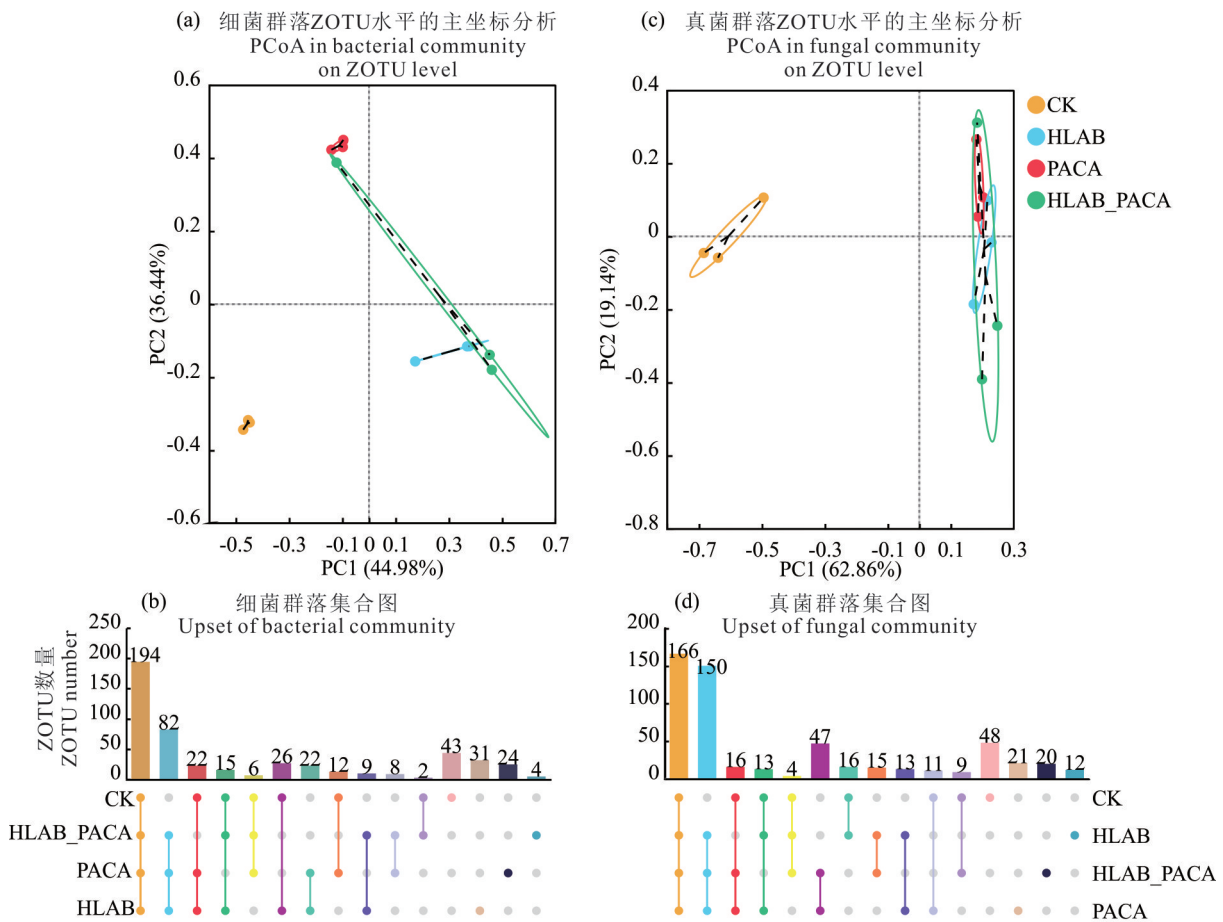


图 2 水稻秸秆青贮中细菌群落和真菌群落的主坐标分析和群落集合图

Fig. 2 Principal coordinates analysis (PCoA) and upset analysis of bacterial community and fungal community in rice straw silage

添加剂处理组之间共享了 82 个 ZOTU。在各处理组独有的 ZOTU 方面,CK 最多,有 43 个,HLAB_PACA 最少,只有 4 个。在真菌群落(图 2c)中 PC1 和 PC2 轴对结果的解释度分别为 62.86% 和 19.14%,在图中单维度即可将

CK组和其他3个添加剂处理组明确区分开。图2d给出了真菌群落中各处理组ZOTU之间的集合,可以看出3个添加剂处理组共有的ZOTU数量达到了150个,与4个处理组共有ZOTU数量166个非常接近。在独有ZOTU方面,CK具有的数量最多(48个),而HLAB组最少(12个)。

2.6 青贮90 d后水稻秸秆中添加剂对细菌群落组成的影响

添加剂对水稻秸秆青贮饲料中细菌群落组成的影响见图3。CK、HLAB和HLAB_PACA处理都是芽孢杆菌门(Bacillota,原厚壁菌门)占据主导(图3a),其中CK组最高,芽孢杆菌门占比达到了86.84%,其他两个处理芽孢杆菌门占比也分别达到了74.83%和73.31%。将芽孢杆菌门依次向下分解,主导纲(图3b)、目(图3c)、科(图3d)的分别是芽孢杆菌纲(Bacilli)、乳杆菌目(Lactobacillales)及乳杆菌科(Lactobacillaceae),CK、HLAB和

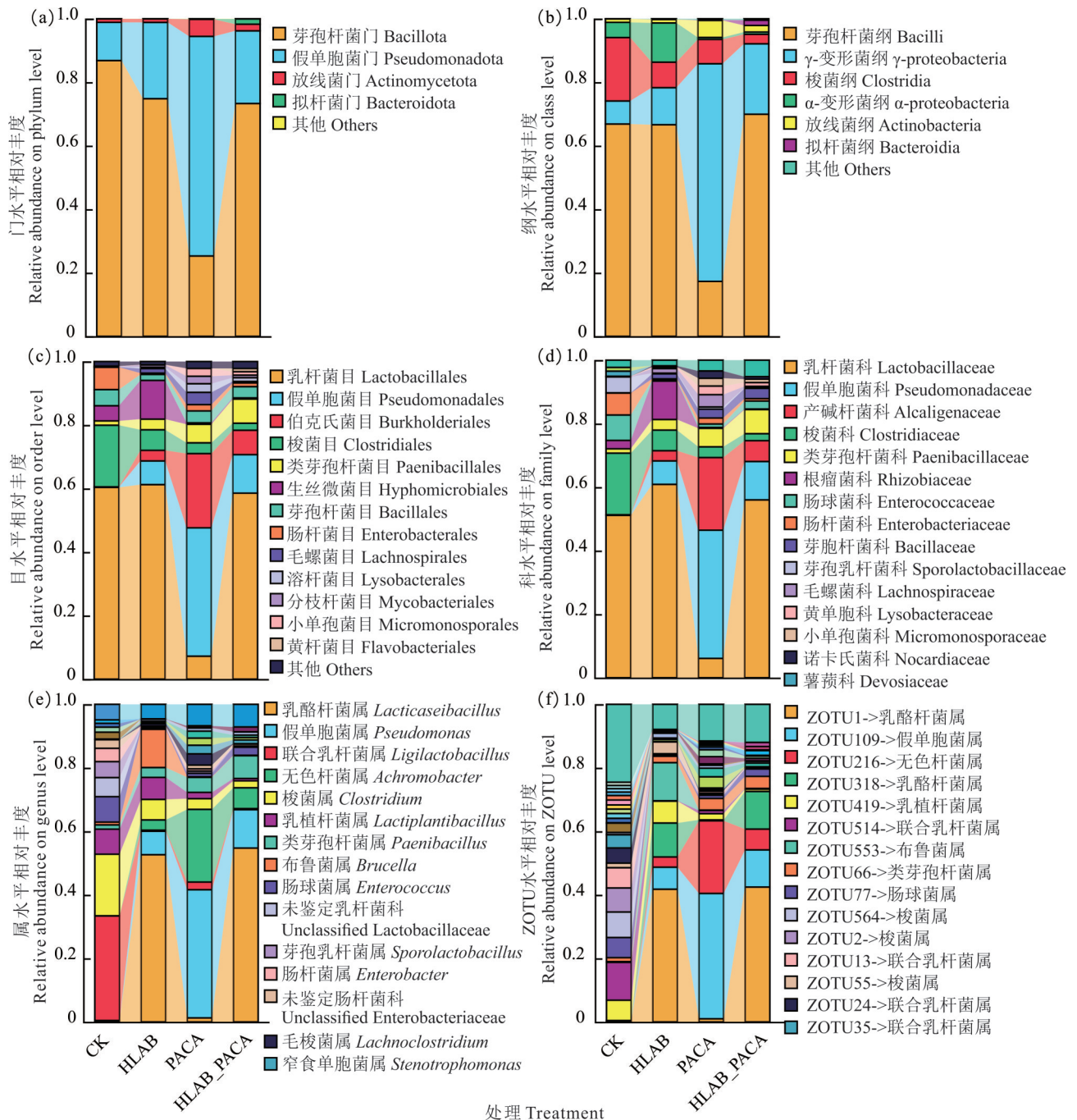


图3 水稻秸秆青贮细菌群落组成分析

Fig. 3 Analysis of the bacterial community composition in rice straw silage

HLAB_PACA 处理组占比都比较接近,并没有出现明显差异。直到属水平(图 3e)的 CK 组与 HLAB 和 HLAB_PACA 组表现出明显的不同,其中 HLAB 和 HLAB_PACA 组占比最多的都是乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*),而 CK 组占比最多的是联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)。对乳杆菌科各属进一步 ZOTU 分析(图 3f)可以看到,CK 组中没有一个主导的 ZOTU 来代表联合乳杆菌属,其中有 5 种占比超过 1% 的 ZOTU 共同组成联合乳杆菌属,包括 ZOTU514(11.89%)、ZOTU13(6.39%)、ZOTU24(4.77%)、ZOTU35(4.15%)和 ZOTU332(1.02%),加上乳酪杆菌属中的 ZOTU1(0.237%)和 ZOTU318(0.0528%),乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)的 ZOTU419(6.39%),在产乳酸的乳杆菌科中表现出了极高的 ZOTU 多样性。HLAB 组中占据主导的乳酪杆菌属主要由 ZOTU1(41.8%)和 ZOTU318(10.7%)组成,加上乳植杆菌属的 ZOTU419(6.89%)。HLAB_PACA 则只剩乳酪杆菌属的 ZOTU1(42.5%)和 ZOTU318(11.8%),其他乳杆菌科的 ZOTU 占比均低于 1%。

门水平上 PACA 组就与其他 3 个处理组相比表现出了明显区别,它的主导门是假单胞菌门(*Pseudomonadota*, 69.15%),另外放线菌门(*Actinomycetota*)相对 CK 组有所增加(5.37% vs 1.10%)。假单胞菌门的这种差异可以一直追溯到假单胞菌属(*Pseudomonas*)的 ZOTU109(39.5%)和无色杆菌属(*Achromobacter*)的 ZOTU216(22.9%)。CK 组中的 ZOTU109(0.112%)和 ZOTU216(0.0519%)占比不足 1%,并且这两个 ZOTU 在 LAB 和 HLAB_PACA 组中的占比都比 PACA 组要小得多。在梭菌属(*Clostridium*)中 ZOTU 也表现出了多样性,CK 组中有 ZOTU 占比前 15 的 ZOTU564(8.03%)、ZOTU2(7.57%)和 ZOTU55(1.44%)以及一个占比高于 0.5% 的 ZOTU110(0.673%),这些都属于梭菌属。其他 3 个处理组中只有 HLAB 组的 ZOTU110(1.53%)和 ZOTU55(3.71%)占比超过 1%,其他的都在 1% 以下。

2.7 青贮 90 d 后水稻秸秆中添加剂对真菌群落组成的影响

添加剂对水稻秸秆青贮饲料中真菌群落组成的影响见图 4。在门水平上(图 4a)鉴定出两种主要的真菌门,分别为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*),两者相加在所有处理组中占比均超过 90%,在 HLAB_PACA 组中两个真菌门加和占比达到了 99.7%。从纲水平开始,CK 组与其他 3 个处理组表现出了明显差别。占据主导地位纲由 CK 组中的粪壳菌纲(*Sordariomycetes*, 图 4b)、肉座菌目(*Hypocreales*, 图 4c)、生赤壳科(*Bionectriaceae*, 图 4d)的瓦尔索赤壳属(*Valsonectria*, 图 4e)转变为了其他 3 个添加剂处理组的散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)、散囊菌目(*Eurotiales*)、曲霉科(*Aspergillaceae*)的曲霉菌属(*Aspergillus*)和红曲霉属(*Monascus*)。在 ZOTU 占比(图 4f)中排第 1 位的 ZOTU1 属于曲霉菌属。从 ZOTU1 看 CK 中的占比最小,为 0.49%,HLAB、PACA 和 HLAB_PACA 添加剂处理组的占比分别达到 22.3%、31.9% 和 27.1%。排名第 2 位的 ZOTU215 属于红曲霉属,其中 CK 组中 ZOTU215 占比最低,不到 0.01%,HLAB、PACA 和 HLAB_PACA 组中 ZOTU215 的占比分别达到了 19.83%、10.05% 和 35.81%。

2.8 青贮 90 d 后水稻秸秆中霉菌毒素污染

添加剂对水稻秸秆青贮饲料中微生物群落中的曲霉科的相对丰度、孟加拉红平板培养霉菌数量、黄曲霉毒素 B1 和玉米赤霉烯酮的影响见表 5。在添加 3 种添加剂处理后曲霉科的相对丰度极显著增加($P < 0.01$),其中以 HLAB_PACA 组最高。同样水稻秸秆青贮中的霉菌数量受到添加剂的极显著影响($P < 0.01$)。CK 组取样后在孟加拉红培养基中未培养出霉菌,使用添加剂的处理组都检出了少量的霉菌。所有处理组中的黄曲霉毒素 B1 和玉米赤霉烯酮含量都很低,但是 HLAB_PACA 和 PACA 组的黄曲霉毒素 B1 含量略有提高($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 青贮前后水稻秸秆中 NSC 的变化

青贮原料的 NSC 含量对于水稻秸秆发酵具有重要作用,可以为原料附着的乳酸菌提供足够的糖类物质用于乳酸发酵。NSC 含量较高的植物原料更容易进行乳酸菌发酵,尤其是玉米(*Zea mays*)青贮^[9]。在水稻秸秆等谷物秸秆的利用上,研究者往往将关注点放在结构性碳水化合物例如纤维素和半纤维素的降解来提供葡萄糖等糖

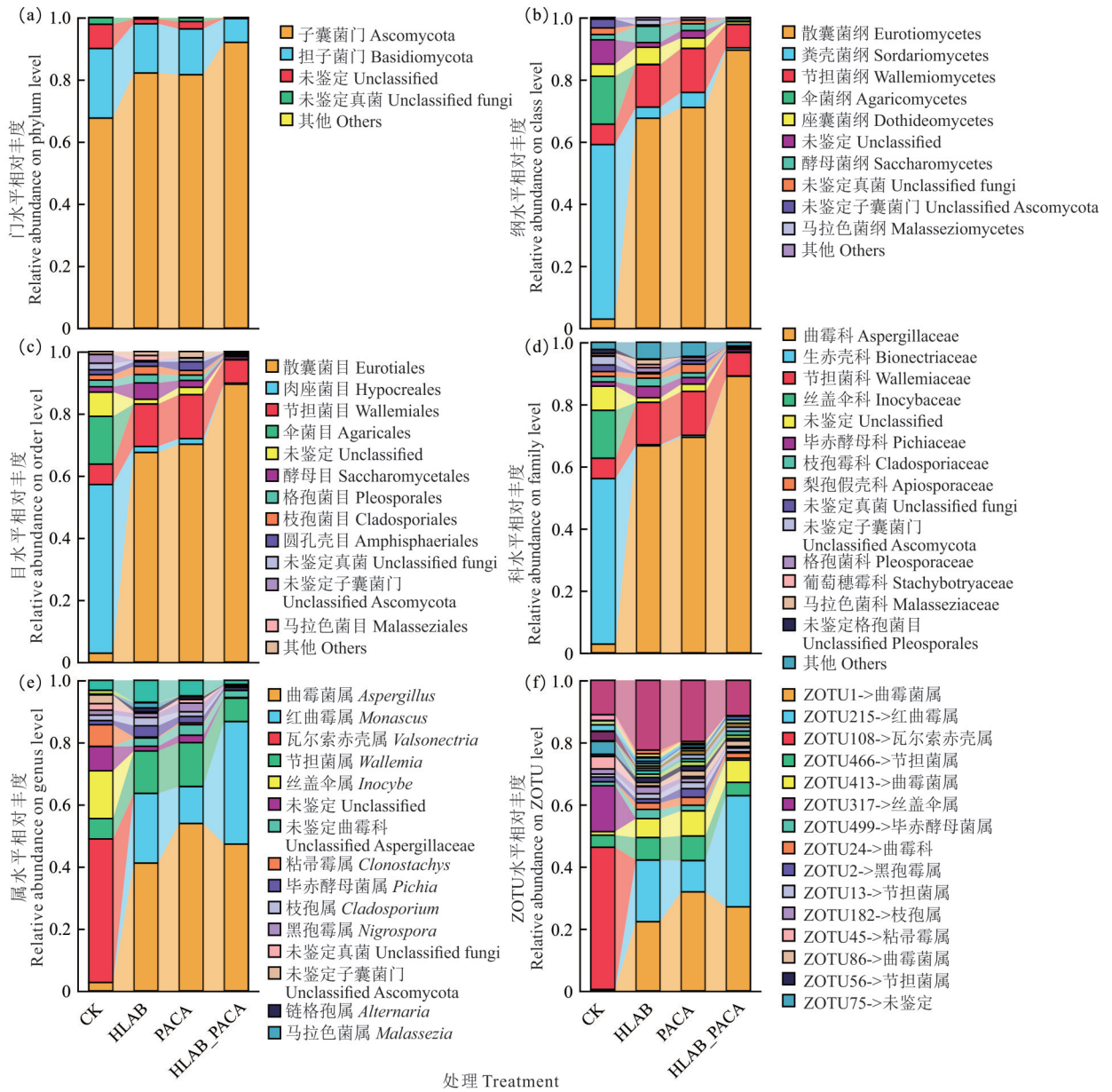


图4 水稻秸秆青贮真菌群落组成分析

Fig. 4 Analysis of the fungal community composition in rice straw silage

表5 90 d青贮后水稻秸秆中微生物和潜在霉菌毒素污染风险

Table 5 Potential mycotoxin risks of microorganisms in rice straw silage after 90 d of ensiling

| 方法 Method | 处理方式 Processing method | 项目 Item | 处理组 Treatment group | | | | 标准误 SEM | 显著性 P-value |
|------------------------------|--|--|---------------------|--------------|--------------|--------------|------------|----------------|
| | | | CK | HLAB | PACA | HLAB_PACA | | |
| 真菌多样性 Fungal diversity | PCR 扩增 PCR amplification | 曲霉科相对丰度 Relative abundance of Aspergillaceae (%) | 2.8±1.93c | 66.7±3.28b | 69.4±3.75b | 89.0±3.95a | 9.880 | *** |
| 平板培养法 Plate count method | 梯度稀释和培养基 Gradient dilution and culture medium | 霉菌数 Moulds count (log CFU·g ⁻¹) | NDb | 2.06±0.161a | 1.53±0.250a | 1.57±0.274a | 0.249 | *** |
| 霉菌毒素分析 Mycotoxin analysis | 甲醇萃取 Methanol extraction | 黄曲霉毒素 B1 含量 Aflatoxin-B1 count (μg·kg ⁻¹ DM) | 0.521±0.206a | 0.222±0.025a | 1.500±1.210a | 0.869±0.014a | 0.298 | NS |
| | | 玉米赤霉烯酮含量 Zearalenone count (μg·kg ⁻¹ DM) | 95.8±0.126a | 97.8±0.667a | 96.0±0.970a | 95.7±0.571a | 0.387 | NS |

类物质^[10],或者外源添加糖类物质来提升秸秆营养物质^[11]。但是在实际生产中不同品种的水稻秸秆含糖量差异巨大,因此可通过适当的品种选择来使得收获的水稻秸秆具有足够的 NSC 用来发酵。Dong 等^[12-13]的研究表明,部分品种的水稻秸秆中含有足够的 NSC 并且 NSC 含量与发酵品质和体外干物质消化率显著正相关。本研究中收获的水稻秸秆具有丰富的 NSC 含量($149 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$)以及足够的葡萄糖($24.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$)和果糖含量($31.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$),能够满足乳酸菌的青贮发酵需求。在水稻秸秆中蔗糖含量较少,可溶性糖成分主要是葡萄糖和果糖。水稻秸秆在 90 d 的青贮发酵后葡萄糖和果糖含量都出现了大幅下降,说明自然发酵过程中绝大部分葡萄糖和果糖被青贮微生物消耗掉了。在青贮初期,葡萄糖的消耗速度通常快于果糖^[14],这能够解释青贮发酵后 CK 组中的残余葡萄糖含量低于果糖含量。3 种添加剂 HLAB、PACA、HLAB_PACA 的使用能够保存更多的葡萄糖,但是对于果糖则无明显影响。这说明添加剂的使用抑制了消耗葡萄糖的其他微生物如丁酸梭菌的活动。淀粉含量在青贮前后同样有一定的降解,这可能是贮藏时间较长导致的^[15]。HLAB 组中的复合乳酸菌添加剂能够抑制其他微生物的繁殖及对淀粉的损耗,其处理过的水稻秸秆青贮淀粉含量与原料淀粉含量最接近。

3.2 添加剂对水稻秸秆青贮发酵品质和营养品质的影响

乳酸菌快速发酵产生乳酸是降低青贮发酵过程 pH 的关键步骤。理想的青贮 pH 应该低于 4.2。然而,在未添加外源添加剂的情况下,水稻秸秆青贮自然发酵情况下 pH 为 4.96,乳酸含量仅为 $7.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$,表明乳酸菌未能发挥应有的作用,尽管 16S 扩增子分析显示在 CK 组中乳杆菌科仍占据主导地位。相反丁酸($21.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$)和氨态氮含量($208 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)显著高于预期水平,而且在 CK 组发现梭菌属且在细菌群落中的占比明显高于其他处理组。这说明在没有外源添加剂的情况下产丁酸的梭菌在水稻秸秆中耗费了大量的 NSC^[16]。过量的丁酸和氨态氮不仅会使青贮发酵品质下降,气味难闻,而且对于反刍动物会造成严重的负面效应如代谢紊乱、腹泻等^[17]。因此使用外源添加剂来改善水稻秸秆青贮发酵品质,降低丁酸和氨态氮含量对于反刍动物十分有必要。复合乳酸菌添加剂(HLAB)和丙酸钙(PACA)等添加剂的使用显著降低了水稻秸秆青贮中的丁酸和氨态氮含量,显著提升了乳酸含量,降低了乙酸含量和 pH,且没有明显提高乙醇含量。同时这些添加剂还导致葡萄糖的更多保留以及发酵品质的改善,这进一步降低了 NDF 和 ADF 的含量,乳酸菌添加剂在其中发挥了重要的作用,这一发现与 Sun 等^[18]的研究结果一致。同时研究表明^[19]化学添加剂如丙酸钙等对发酵品质同样也有促进作用,本研究结果与之一致。

3.3 添加剂对水稻秸秆青贮细菌多样性的影响

除了常见的植物乳杆菌、布氏乳杆菌等乳酸菌以外,在青贮过程中还有许多其他的乳酸菌属和细菌、酵母菌等都参与厌氧发酵,这些微生物的共同作用显著增加了青贮发酵过程中的微生物多样性。然而传统平板培养技术以及变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法仅能分离和鉴定出青贮饲料中占优势地位的少量乳杆菌和乳球菌菌种。这些方法无法全面评估整个微生物群落的结构及其成员之间的相互关系^[20-21]。随着 16S rRNA 基因等扩增子高通量测序技术的成熟,研究人员能够对青贮饲料中的微生物群落进行更深入分析。目前,高通量测序仪对青贮饲料群落的测序为 4 万~6 万条,极大提升了人们对于青贮发酵过程中微生物多样性的认识^[22]。通过高通量测序技术得到的最基本单元有基于 97% 相似度阈值构建的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),也有使用 UNOISE 算法(unoise3 命令)输出的有效生物序列 ZOTU 以及相似的扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)^[23]。ZOTU 更有利于区分物种以及种内变异,区分不同表型的相关菌株,但也会带来许多在数据库中未有过的 ZOTU,这些在以前被以 97% 的相似度归类到已知 OTU。通过抽取未知 ZOTU 以 97% 相似度进行 Blast 对比表明,这些未知 ZOTU 均为多种属的集合,并非某一种属的集合,故排除它们进行分析有助于更深入地了解青贮微生物的多样性。丙酸钙的使用(PACA 和 HLAB_PACA 组)提升了细菌群落中的 Ace 指数和 Chao1 指数,表明使用丙酸钙处理的水稻秸秆青贮细菌群落物种丰富度更高。这与 Dong 等^[24]在苜蓿(*Medicago sativa*)中添加添加剂抑制梭菌后增加物种丰富度的结果是一致的。因此,在容易出现梭菌发酵产生丁酸的青贮饲料中通过添加剂的使用来增加细菌群落的物种丰富度对于青贮发酵是有益的。

从组成上看,CK组在乳杆菌科中含有5种超过1%的ZOTU,其中联合乳杆菌属的ZOTU514和ZOTU13相对丰度较高。这也能解释为什么水稻秸秆中的NSC含量较高但是青贮发酵效果较差的问题,原始附着乳酸菌本身产酸能力较差,且单个ZOTU占比都不高,导致pH无法快速下降,难以在厌氧阶段抑制梭菌的繁殖,导致葡萄糖等NSC物质被梭菌等其他微生物消耗。相对的,因为添加的复合乳酸菌中有副干酪乳杆菌,所以HLAB和HLAB_PACA组占据主导的乳酸菌变成了乳酪杆菌属的ZOTU1和ZOTU318。乳植杆菌属在青贮前期快速产生乳酸^[25],在青贮后期往往被别的乳酸菌所取代,因此在青贮90 d以后其相对丰度较低。在玉米青贮饲料中的相关研究表明^[26],副干酪乳杆菌同时在229 d的长时间青贮发酵过程中能够产生与自然发酵不同的强烈且独特的特征。梁宇成等^[27]的研究也表明,青贮180 d后副干酪乳杆菌处理的玉米青贮饲料pH最低。这些研究表明副干酪乳杆菌对于长时间贮存处于稳定期的青贮发酵也有明显的效果。因此在添加植物乳杆菌等快速发酵的乳酸菌的同时在青贮后期添加可以存活的乳酸菌(如副干酪乳杆菌)能有效抑制其他细菌在细菌群落中的占比。

3.4 添加剂对水稻秸秆青贮真菌多样性的影响及霉菌毒素污染风险

好氧真菌虽然在厌氧状态下受到抑制,但是青贮发酵过程往往难以完全使好氧真菌失活。随着贮藏时间的延长,氧气重新渗透进青贮饲料中往往导致耐酸酵母和霉菌等重新繁殖造成发热和霉变。曲霉菌属、镰刀菌属等霉菌还会产生霉菌毒素从而污染青贮饲料,给反刍动物生产性能和健康造成严重的负面影响^[28-29]。CK组中丁酸含量高,同样对于产毒真菌有抑制作用^[30],且其效果往往强于乳酸。因此,HLAB和PACA组相比CK组显著提高了真菌群落的香农指数并降低了辛普森指数,经过乳酸菌或者丙酸钙处理的水稻秸秆青贮中真菌物种多样性更高。这可能是由于CK组中高含量的丁酸对真菌有抑制效果从而降低了物种多样性。香农指数和辛普森指数是表征物种群落丰富度和均匀度的两个相反指数^[31]。香农指数越高表示真菌群落中的物种丰富度和均一度越高,稀有物种出现的概率更高,因此添加剂提高水稻秸秆青贮饲料的香农指数表明青贮发酵过程真菌群落的稳定性增加,以避免某一个真菌的占比突然增加。复合乳酸菌和丙酸钙的处理组(HLAB_PACA)相比两个单独添加的处理组降低了真菌群落的香农指数并提高了辛普森指数。这可能与属于红曲霉属的ZOTU215增加有关。红曲霉是对动物有益的真菌,且能够与乳酸菌产生协同作用抑制有害微生物^[32]。因此乳酸菌和丙酸钙的复合添加不会对真菌群落造成额外风险。

我国南方地区高温高湿,曲霉菌属往往在饲料中占据很大比例。其中黄曲霉等产毒真菌能够产生黄曲霉毒素B1等真菌毒素危害反刍动物健康和畜产品安全^[33-34]。在水稻秸秆青贮饲料中,添加剂的使用使得青贮饲料中的丁酸含量显著降低到非常低的水平,这使得青贮中抑制真菌由丁酸替换成了抑制真菌效果相对较差的乳酸和乙酸等有机酸^[35],导致曲霉科等真菌污染的风险,霉菌数量及曲霉菌属在真菌群落中的占比有所增加。但是进一步的真菌毒素分析表明,水稻秸秆中的黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮含量均处于极低水平,对反刍动物没有安全风险,并且霉菌数量最高在 $2.06 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右,霉变的风险很小,远低于饲料卫生标准中的限量标准^[36]。

4 结论

本研究对水稻秸秆青贮前后NSC组分的变化进行了分析,并且比较了不同添加剂对于水稻秸秆青贮发酵品质、营养品质、细菌和真菌多样性、霉菌和霉菌毒素污染情况的影响。经过90 d的发酵后,水稻秸秆NSC中的葡萄糖、果糖和淀粉都显著下降。葡萄糖是乳酸菌和梭菌等有害菌竞争的关键NSC组分,添加剂可以抑制梭菌从而保留更多的葡萄糖。添加剂的使用显著提升了水稻秸秆青贮饲料的发酵品质和营养品质,使得丁酸和氨态氮降低到了安全水平,大幅提升了乳酸的产量并且将pH降低到了4.1以下。添加剂的使用改变了水稻青贮饲料的细菌和真菌多样性。使用包含由副干酪乳杆菌的复合乳酸菌添加剂可以使得水稻秸秆中的发酵乳酸菌由以联合乳杆菌属为主、ZOTU数量众多且相对丰度普遍较小变为乳酪杆菌属为主的细菌群落结构。乳酸菌和丙酸钙的复合添加与乳酸菌和丙酸钙两者单独添加相比,辛普森指数上升而香农指数下降,表现出真菌群落多样性下降。所有添加剂的使用增加了曲霉科真菌的相对丰度并且增加了霉菌数量,但是黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮等霉菌毒素含量极低且并没有随着添加剂的使用而明显增加。对于青贮NSC组分的分析有助于明确青贮原料的实际

发酵底物,有针对性地选择可用添加剂。添加复合乳酸菌等接种剂和丙酸钙等有机盐有助于提升水稻秸秆青贮的发酵品质、营养品质并且改善细菌群落的多样性。

参考文献 References:

- [1] Li N S, Cheng Y F. Potential and current status of feed utilization of rice straw. *Feed Industry*, 2025, 46(8): 157–162.
李年顺, 成艳芬. 水稻秸秆饲料化利用的潜力与现状. *饲料工业*, 2025, 46(8): 157–162.
- [2] Yu Z, Sun Q Z. *Silage technology of grass and forage*. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.
玉柱, 孙启忠. 饲草青贮技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2011.
- [3] Li P, Zhang Y, Gou W L, *et al.* Silage fermentation and bacterial community of bur clover, annual ryegrass and their mixtures prepared with microbial inoculant and chemical additive. *Anim Feed Science and Technology*, 2019, 247: 285–293.
- [4] Dong C F, Xu N X, Zhang W J, *et al.* Content and distribution of nonstructural carbohydrates compositions in different parts of rice (*Oryza sativa* L.) straw. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 38(1): 165–171.
董臣飞, 许能祥, 张文洁, 等. 稻草中非结构性碳水化合物不同组分的含量与分布. *江苏农业学报*, 2022, 38(1): 165–171.
- [5] Tian J P, Xu N X, Liu B Y, *et al.* Interaction effect of silo density and additives on the fermentation quality, microbial counts, chemical composition and *in vitro* degradability of rice straw silage. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122412.
- [6] Chen X Z, Dong C 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.
- [7] Zhao J, Dong Z H, Li J F, *et al.* Evaluation of *Lactobacillus plantarum* MTD1 and waste molasses as fermentation modifier to increase silage quality and reduce ruminal greenhouse gas emissions of rice straw. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 143–152.
- [8] Wang S R, Ding C L, Tian J P, *et al.* Evaluation of growth stage and storage time on fermentation characteristics, microbial community structure, co-occurrence networks, and their functional shifts and pathogenic risk of fermented italian ryegrass. *LWT-Food Science and Technology*, 2025, 215: 117272.
- [9] 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.
- [10] Kaewpila C, Thip-uten S, Cherdthong A, *et al.* Impact of cellulase and lactic acid bacteria inoculant to modify ensiling characteristics and *in vitro* digestibility of sweet corn stover and cassava pulp silage. *Agriculture-Basel*, 2021, 11(1): 66.
- [11] Wang Y, Yu J, Li Q, *et al.* Screening the carbon source type in solid-state fermentation with *Phanerochaete chrysosporium* to improve the forage value of corn straw and rice straw. *Animals*, 2023, 13(5): 888.
- [12] Dong C F, Xu N X, Ding C L, *et al.* Rapid evaluation method for rice (*Oryza sativa* L.) straw feeding quality. *Field Crops Research*, 2018, 228: 204–209.
- [13] Dong C F, Xu N X, Ding C L, *et al.* Developing ratoon rice as forage in subtropical and temperate areas. *Field Crops Research*, 2020, 245: 107660.
- [14] Zhao J, Wang S R, Dong Z H, *et al.* Effect of storage time and the level of formic acid on fermentation characteristics, epiphytic microflora, carbohydrate components and *in vitro* digestibility of rice straw silage. *Animal Bioscience*, 2021, 34(6): 1038–1048.
- [15] Saylor B A, McCary C L, Diepersloot E C, *et al.* Effect of forage processor roll gap width and storage length on fermentation profile, nutrient composition, kernel processing score, and starch disappearance of whole-plant maize silage harvested at three different maturities. *Agriculture-Basel*, 2021, 11(7): 574.
- [16] Sushkova V I, Zhukovskii S V, Berezina O V, *et al.* Biosynthesis of butyric acid from cabbage stem and molasses by the strain *Clostridium butyricum* VKPM B-9619. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2013, 39(7): 771–776.
- [17] Usman·Daguti, Li J. Prevention and treatment of butyric acid-induced diarrhea in cattle and sheep. *China Animal Health*, 2025, 27(3): 58–59.
吾斯曼·达古提, 李晶. 牛羊丁酸所致腹泻的预防与治疗. *中国动物保健*, 2025, 27(3): 58–59.
- [18] Sun H, Liao C S, Lu G R, *et al.* Role of *Lactiplantibacillus paraplantarum* during anaerobic storage of ear-removed corn on

- biogas production. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128061.
- [19] Xu G F, Li X B, Hu J F, *et al.* An evaluation of the effectiveness of four chemical additives on the fermentation characteristics, *in vitro* digestibility and aerobic stability of total mixed ration silage based on soy sauce residue. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2025, 109(1): 130–139.
- [20] Wang C, Han H Y, Gu X Y, *et al.* A survey of fermentation products and bacterial communities in corn silage produced in a bunker silo in China. *Animal Science Journal*, 2014, 85(1): 32–36.
- [21] Li D X, Ni K K, Pang H L, *et al.* Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(5): 620–631.
- [22] Yao Z H, Zhu Y, Wu Q, *et al.* Challenges and perspectives of quantitative microbiome profiling in food fermentations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(15): 4995–5015.
- [23] Edgar R. SINTAX: A simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*, 2016: 074161, doi: <https://doi.org/10.1101/074161>.
- [24] Dong C, Liu P, Wang X, *et al.* Effects of phenyllactic acid on fermentation parameters, nitrogen fractions and bacterial community of high-moisture stylo silage. *Fermentation*, 2023, 9(6): 572.
- [25] Assouhoun-Djeni N M C, Djeni N T, Messaoudi S, *et al.* Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d’Ivoire. *Food Control*, 2016, 62: 397–404.
- [26] Squara S, Ferrero F, Tabacco E, *et al.* Effect of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lactocaseibacillus paracasei* on the maize silage volatilome: The advantages of advanced 2D-chromatographic fingerprinting approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(38): 12232–12248.
- [27] Liang Y C, Zhang X W, Shao T, *et al.* Effects of different lactic acid bacteria strains on fermentation quality and mycotoxin contents of whole-plant corn silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(3): 123–133.
梁宇成, 张晓雯, 邵涛, 等. 乳酸菌对全株玉米青贮发酵品质和霉菌毒素含量的影响. *草业学报*, 2025, 34(3): 123–133.
- [28] Banati H, Darvas B, Feher-Toth S, *et al.* Determination of mycotoxin production of fusarium species in genetically modified maize varieties by quantitative flow immunocytometry. *Toxins*, 2017, 9(2): 70.
- [29] Ferrara M, Haidukowski M, D’Imperio M, *et al.* New insight into microbial degradation of mycotoxins during anaerobic digestion. *Waste Management*, 2021, 119: 215–225.
- [30] Garnier L, Penland M, Thierry A, *et al.* Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 322: 108574.
- [31] Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, *et al.* Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME Journal*, 2013, 7(6): 1092–1101.
- [32] Zhang M, Pei L, Zhang X. Effects of different kinds of probiotics on performance, nutrient digestibility and intestinal flora of laying hens. *Feed Industry*, 2017, 38(3): 28–32.
张敏, 裴蕾, 张鑫. 不同微生态制剂对蛋鸡生产性能、养分消化率和肠道菌群影响. *饲料工业*, 2017, 38(3): 28–32.
- [33] Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A, *et al.* Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Journal de Mycologie Medicale*, 2015, 25(4): 263–267.
- [34] Han R, Tang T, Zhang M N, *et al.* Analysis of mycotoxin contamination of green roughage in some sheep farms. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2023, 29(Z1): 151–155.
韩睿, 唐涛, 张孟恩, 等. 部分羊场青储饲料霉菌毒素污染状况分析. *安徽农学通报*, 2023, 29(Z1): 151–155.
- [35] Moon Y S, Kim H M, Chun H S, *et al.* Organic acids suppress aflatoxin production via lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus*. *Food Control*, 2018, 88: 207–216.
- [36] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People’s Republic of China, Standardization Administration of the People’s Republic of China. Hygienical standard for feeds: GB 13078–2017. Beijing: Standards Press of China, 2017.
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料卫生标准: GB 13078–2017. 北京: 中国标准出版社, 2017.