

接种异常毕赤酵母对干玉米秸秆与废弃白菜混贮品质的动态影响及微生物群落结构分析*

任海伟^{1,2,3} 唐多利¹ 康宝¹ 王昱^{2,3} 李志忠^{1**} 张东^{2,3} 王蕾¹ 李盼盼¹

¹兰州理工大学生命科学与工程学院 兰州 730050

²兰州理工大学西部能源与环境研究中心 兰州 730050

³甘肃省生物质能与太阳能互补供能系统重点实验室 兰州 730050

摘要 为提升干玉米秸秆与废弃白菜的混贮品质,研究接种异常毕赤酵母 (*Pichia anomala*) 对干玉米秸秆与废弃白菜混贮发酵品质的动态影响. 试验设置无添加剂对照组 (ME) 和微生物处理组 (PA), 连续恒温贮存发酵170 d, 间隔一定时间分析感官质量、有机组分和发酵品质, 并利用高通量测序技术考察发酵过程中细菌群落的动态变化. 结果显示: 与ME组相比, 贮存170 d期间PA组中的干物质、粗蛋白、可溶性碳水化合物和乳酸含量显著增加 ($P < 0.05$), pH值、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量显著降低 ($P < 0.05$), 乳酸/乙酸和乳酸/总有机酸比值得到优化. 细菌群落结构显示: PA组中门水平优势菌为厚壁菌 (Firmicutes) 和变形菌 (Proteobacteria), 属水平优势菌为乳杆菌 (*Lactobacillus*) 和类乳杆菌 (*Paralactobacillus*). 接种异常毕赤酵母能使肠杆菌 (*Enterobacter*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和黄杆菌 (*Flavobacterium*) 等腐败菌的相对丰度逐步降低, 130 d时肠杆菌消失, 有益乳酸菌的总丰度始终保持在50%以上. 本研究表明接种异常毕赤酵母能改善干玉米秸秆与白菜的混贮发酵品质, 使干秸秆能保质贮存近半年时间, 结果可为其资源化利用提供原料保障. (图5 表5 参38)

关键词 异常毕赤酵母; 干玉米秸秆; 废弃白菜; 发酵品质; 细菌群落多样性

CLC TQ92 : X712

Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on the mixed storage quality of dry maize straw and cabbage wastes and their microbial communities*

REN Haiwei^{1,2,3}, TANG Duoli¹, KANG Bao¹, WANG Yu^{2,3}, LI Zhizhong^{1**}, ZHANG Dong^{2,3}, WANG Lei¹ & LI Panpan¹

¹School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

²China Western Energy & Environment Research Center, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

³Key Laboratory of Complementary Energy System of Biomass and Solar Energy, Lanzhou 730050, China

Abstract To improve the mixed storage quality of dry maize straw and cabbage wastes, the effects of *Pichia anomala* inoculation on their fermentation quality was studied. The experiment was conducted with an additive-free control group (ME group) and a microbial treatment group inoculated with *Pichia anomala* (PA group). The two feedstocks were continuously stored and fermented at a constant temperature for 170 days in accordance with ensiling theory, and their sensory quality, chemical composition, and fermentation quality were analyzed at different intervals during this process. The high-throughput sequencing technology of Illumina Miseq was used to investigate the changes in bacterial community diversity that occurred during mixed ensiling. The results showed that the content of dry matter, crude protein, water soluble carbohydrates, and lactic acid in the PA group increased significantly over time compared to those in the ME group ($P < 0.05$). In contrast, the pH and content of acid detergent fiber and neutral detergent fiber in the PA group decreased significantly compared to those in the ME group over 170 days of storage ($P < 0.05$). The ratio of lactic acid to acetic acid and that of lactic acid to total organic acids were both improved by inoculation with *P. anomala*, which showed that *P. anomala* improved the fermentation quality of the ensilage. The results of analyses of bacterial community diversity showed that the bacterial communities in the PA group

收稿日期 Received: 2018-07-25 接受日期 Accepted: 2018-09-04

*国家自然科学基金项目 (51666010, 51366009, 51806093)、中国博士后科学基金面上项目 (2018M631217)、甘肃省自然科学基金项目 (1606RJZA206, 1606RJYA287, 1606RJZA196, 17JR5RA117) 和兰州市科技计划项目 (2014-2-20) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (51666010, 51366009), the China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2018M631217), the Natural Science Foundation of Gansu Province (1606RJZA206, 1606RJYA287, 1606RJZA196, 17JR5RA117) and the Science and Technology Projects of Lanzhou City (2014-2-20)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zzli2004@lut.cn)

(inoculated with *Pichia anomala*) were dominated by the Firmicutes and Proteobacteria at the phylum level, and *Lactobacillus* and *Paralactobacillus* were dominant at the genus level. The abundances of spoilage bacteria, such as *Enterobacter*, *Pseudomonas*, and *Flavobacterium*, decreased after inoculation with *P. anomala*, and *Enterobacter* disappeared after storage for 130 days. The total abundance of lactic acid bacteria in the PA group always remained above 50%. In conclusion, it was found that inoculation with *P. anomala* can improve the fermentation quality of dry maize straw and cabbage wastes so that dried straw can be stored for nearly half a year before its use.

Keywords *Pichia anomala*; dry maize straw; cabbage wastes; fermentation quality; microbial community diversity

作物秸秆是常见的饲草和能源作物, 全国秸秆理论资源量约10.4亿吨, 可收集资源量约9亿吨, 其中玉米秸秆资源量高达2.6亿吨, 约占秸秆资源总量的25%。由于我国玉米种植多为粮食用途, 大多数玉米秸秆在摘穗、萎蔫或干黄后才被收获, 导致水分、糖分大量流失, 木质化程度严重, 使其有效利用率大大降低。另一方面, 干黄秸秆的季节性收获也使其资源化利用带来诸多限制。利用青贮原理将干黄秸秆与高水分、高养分等物料进行混贮, 不仅能实现干秸秆长时间保质贮存, 还能提高饲用或能源化利用效能^[1]。国内外学者已证实干黄秸秆与废弃蔬菜(甘蓝菜、韭菜、芹菜、花椰菜)、甜菜渣、玉米浆、马铃薯渣等废弃物能混贮保存^[2-3], 本课题组前期也研究了干黄秸秆与废弃白菜、莴笋叶的混贮效果, 发现白菜和莴笋叶在贮存过程中被分解消纳, 贮存60 d时的秸秆湿润柔嫩, 发酵品质良好, 既解决了干秸秆贮存问题, 又转化利用了废弃蔬菜^[4]。然而, 上述研究的贮存时间还较短(2月左右), 若要真正实现干秸秆的高品质、跨季节(秋冬, 4-5个月)贮存, 必须在更长贮存周期条件下研究混贮过程及其品质调控方法。

研究表明, 混贮过程中加入适宜添加剂能起到调控发酵品质的积极作用, 其中乳酸菌(单一或复合)是常用的青贮发酵接菌剂。Sun等发现接种乳酸菌能提高青贮玉米秸秆的乳酸浓度, 减少青贮期间干物质和粗蛋白的损失^[5]。Li等研究发现复合菌剂(包括*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*和*Lactobacillus buchneri*)能显著增加干稻秸和玉米浆混贮体系中乳酸菌数量, 提高混贮品质^[6]。Acosta等发现复合添加剂BSM(*Enterococcus faecium*, *L. plantarum*和*Lactobacillus brevis*)能使青贮玉米秸秆pH值快速下降, 总有机酸、乳酸和乙酸浓度明显提高, 且丁酸、乙醇及氨态氮浓度显著降低^[7]。除常用的乳酸菌剂外, 也有学者将枯草芽孢杆菌、丙酸杆菌、黑曲霉、热带假丝酵母等微生物用于青贮调控过程^[8]。王凤林等认为枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌同时添加有助于提升玉米秸秆青贮品质^[9]。李红亚等认为解淀粉芽孢杆菌复合菌剂能有效降解玉米秸秆中木质纤维素^[10]。Filya等发现丙酸杆菌和植物乳杆菌能增加玉米和高粱青贮体系的乳酸含量, 且抑制乙酸和丙酸生成^[11]。唐振华等发现黑曲霉和热带假丝酵母能显著提高甘蔗尾青贮过程中的乳酸含量^[12]。

异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)是一种嗜杀酵母, 生长繁殖过程中产生的嗜杀因子能杀死同族或者亲缘关系较近的菌株, 但对其本身产生的嗜杀因子具有免疫性^[13], 常用于保存果蔬、粮食谷物, 具有良好生物控制作用。Boysen等发现异常毕赤酵母能明显抑制湿小麦贮存过程中的罗克福尔青霉

(*Penicillium roqueforti*)、肉青霉(*Penicillium carneum*)和展青霉(*Penicillium paneum*)等霉菌^[14]。Olstorpe等认为异常毕赤酵母能明显改善缺乏足够乳酸菌数量情况下的湿大麦卫生等级^[15]。Coda等发现面团发酵过程中异常毕赤酵母和植物乳杆菌能互利共生产生抗真菌物质, 延长面包货架期^[16]。更重要的是, 异常毕赤酵母能耐受低pH、低水活度、高渗透压、厌氧等极端环境^[17], 具备用于秸秆青贮的潜力。但有关异常毕赤酵母菌用于秸秆与废弃蔬菜混合贮存过程调控的文献尚未见报道。

为提升干秸秆和废弃蔬菜的混贮品质, 我们将异常毕赤酵母作为接种剂添加于二者混贮过程, 系统研究干玉米秸秆和废弃白菜连续混合贮存170 d期间接种异常毕赤酵母对有机物组分、感官质量和发酵特性等混贮品质的动态影响, 并利用Illumina MiSeq高通量测序技术解析混贮发酵过程中的微生物多样性, 探讨异常毕赤酵母对混贮品质的调控效果和可行性, 为改善干玉米秸秆与废弃白菜混贮品质、寻找新的微生物菌剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

干玉米秸秆(Dry maize straw, DMS)取自甘肃省陇西县, 摘穗后田间留置3个月后收集, 含水量为10.23%, 粉碎至0.5-1 cm备用; 废弃白菜(Cabbage waste, CW)收集自兰州市七里河区职工菜市场, 含水量为91.41%, 切碎至2 cm × 2 cm备用^[4]。异常毕赤酵母来源于中国工业微生物菌种保藏中心(CICC), 菌种编号1852。

异常毕赤酵母菌悬液制备: 按照说明书活化后接种至PDA(Potato dextrose agar)液体培养基, 28 °C恒温培养72 h使*P. anomala*数量达到 2×10^7 cfu/mL左右。

1.2 混合贮存试验设计

称取9.87 kg 废弃白菜和3.23 kg干玉米秸秆混合均匀, 然后平均分成两份, 其中一份均匀喷洒配制好的异常毕赤酵母菌悬液, 作为微生物处理组(PA组, 接种量为 1×10^6 cfu/g); 另一份均匀喷洒相同体积蒸馏水, 设为对照组(ME组)。混匀后密封、恒温(18 ± 1 °C)贮存于青贮容器中。每个处理设3个平行, 连续混贮发酵170 d, 分别于30 d、60 d、90 d、130 d和170 d时取样分析感官质量、有机物组分、发酵特性和微生物多样性^[4]。

1.3 贮存样品的取样与预处理步骤

按照四分法准确称取两份有代表性的贮存样品20 g, 其中一份按1:9比例加入蒸馏水混合打浆, 用4层纱布和定

性滤纸依次过滤, 3 500 r/min离心15 min后上清液抽滤得到的澄清液为浸提液, 测定pH值后-20 °C冷冻保存, 用于测定氨态氮 (Ammonia nitrogen, AN)、乙醇 (Ethanol, EA)、乳酸 (Lactic acid, LA)、乙酸 (Acetic acid, AA)、丙酸 (Propanoic acid, PPA)、丁酸 (Butyric acid, BA)^[4]。另一份用于细菌多样性分析, 剩余样品用于干物质和有机物组分分析。

1.4 贮存品质的分析方法

1.4.1 感官评定 按照德国农业协会感官评分标准, 以气味、质地和色泽为指标对样品进行感官评价, 满分20分, 评分结果分为优良 (16-20)、尚好 (10-15)、中等 (5-9) 和腐败 (0-4) 4个等级^[18]。

1.4.2 化学成分分析 干物质 (Dry matter, DM) 分析采用105 °C烘干法, 总氮 (Total nitrogen, TN) 测定采用凯氏定氮法, 可溶性碳水化合物 (Water-soluble carbohydrates, WSC) 分析采用硫酸-蒽酮法测定, 中性洗涤纤维 (Neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维 (Acid detergent fiber, ADF)、酸性洗涤纤维木质素 (Acid detergent lignin, ADL) 采用山东海能F800纤维测定仪, 纤维素 (Cellulose, CL) 和半纤维素 (Hemicellulose, HC)、综纤维素 (Holocellulose, HOC) 以及生物降解潜力 (Biodegradation potential, BDP) 通过公式计算: $HC = NDF - ADF$, $CL = ADF - ADL$, $HoC = CL + HC$, $BDP = (HC + CL) / ADL$ ^[2, 4]。

1.4.3 发酵品质分析 乳酸测定采用山东省科学院SBA-40X生物传感器测定, 乙酸、丙酸和丁酸等有机酸测定采用GC9790II气相色谱仪, pH值采用UB-7 pH计测定, 氨态氮测定用苯酚-次氯酸钠比色法^[4]。总挥发脂肪酸 (VFA) 是乙酸、丙酸和丁酸三者含量之和, 总有机酸 (TOA) 是乳酸与总挥发脂肪酸含量之和, 总小分子有机物 (TLO) 为总有机酸和乙醇含量之和。借助费氏评分法评定发酵品质, 满分100分, 评分结果为很好 (81-100分)、好 (61-80分)、合格 (41-60分)、差 (21-40分)、失败 (0-20分) 5个等级^[18]。

1.5 微生物多样性分析

无菌环境下称取60 g样品均分成3份, 分别加200 mL无菌生理盐水混合, 37 °C振荡2 h得到菌悬液, 用直径47 mm、孔径0.22 μm无菌滤膜过滤获得微生物菌体。再用无菌手术剪剪碎整张滤膜, 置于2 mL无菌离心管中, 然后按照Water DNA试剂盒说明步骤提取微生物DNA, 经2%琼脂糖凝胶电泳检测合格后送上海派森诺生物公司Illumina MiSeq平台进行宏基因组测序^[4]。选取相对丰度高于0.1%细菌类群进行门水平和属水平的微生物菌群分析, 并深度分析优势乳酸细菌的多样性^[19]。

1.6 数据分析

基础数据经Excel 2010初步整理并绘制图表, 利用SPSS 18.0软件对实验数据进行统计分析, 以平均值 ± 标准差表示测定结果, $P < 0.05$ 代表数据存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 接种异常毕赤酵母对感官品质的动态影响

感官评价是一种快捷的评定方法, 能对混贮样品是否

变质做出初步判断。取样后的感官结果显示, 贮存30-90 d时ME组和PA组的感官质量均为“优等”, 130 d和170 d时感官品质降为“尚好”, 但未腐败变质。值得注意的是, 贮存30 d时ME组和PA组中的废弃白菜已被分解消失, 干秸秆变得湿润、质地柔软, 带有明显酸醇芳香味且结构完好; 130 d时2个试验组的芳香味变弱, 秸秆变为淡黄色或褐色; 170 d时秸秆外观均呈褐色或暗褐色。就感官质量而言, PA组与ME组的感官质量相同, 但由于评价过程的人为因素影响, 需进一步结合理化分析进行评判。

2.2 接种异常毕赤酵母对干物质含量的动态影响

由图1可知, ME组中干物质含量随时间延长呈显著下降趋势 ($P < 0.05$), PA组的干物质含量呈现“下降—升高—下降—升高”的W型变化趋势。与ME组相比, PA组的干物质含量在30 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$), 在60-170 d期间则显著高于ME组 ($P < 0.05$)。

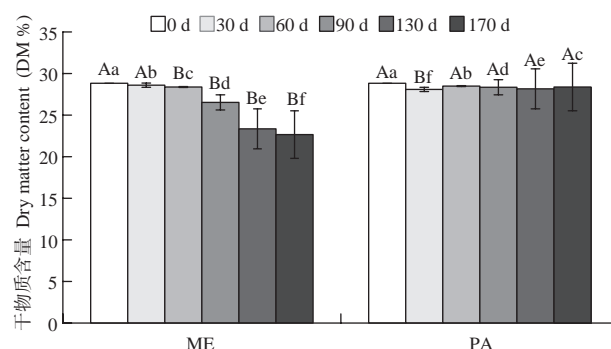


图1 异常毕赤酵母对贮存过程中干物质含量的动态影响。不同大写字母表示相同时间不同处理组差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著 ($P < 0.05$)。ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组。

Fig. 1 Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on the dry matter contents during storage. Different capital letters indicate significant difference in different treatment groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference at different times in the same treatment group ($P < 0.05$). ME: Additive-free control group; PA: microbial treatment group.

2.3 接种异常毕赤酵母对主要有机组分含量的动态影响

由表1可知, 贮存30 d时, ME组和PA组中可溶性碳水化合物含量均显著低于0 d ($P < 0.05$), 贮存60-170 d期间PA组中可溶性碳水化合物含量变化不显著 ($P > 0.05$), 维持在2.81%-3.24%范围, 而ME组则呈现“稳定—下降—升高”的波动趋势。另一方面, PA组在30-170 d期间的可溶性碳水化合物含量始终显著高于ME组 ($P < 0.05$)。从粗蛋白含量变化情况来看, 在170 d贮存周期内ME组和PA组中粗蛋白组分几乎损失殆尽, 贮存30-130 d期间PA组中的粗蛋白含量与ME组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 但170 d时PA组中粗蛋白含量 (2.04%) 显著高于ME组 ($P < 0.05$)。

表2中木质纤维组分变化结果显示, ME组和PA组中的中性洗涤纤维含量均随时间延长呈现总体增加趋势, 且PA组在贮存30-170 d期间的含量始终显著低于ME组 ($P < 0.05$)。与此同时, ME组中的酸性洗涤纤维含量随时间延长总体呈性洗涤木质素是生物质原料的抗降解屏障组分, PA组中酸

表1 异常毕赤酵母对可溶性碳水化合物(WSC)和粗蛋白(CP)含量的动态影响

Table 1 Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on water-soluble carbohydrates (WSC) and crude protein (CP) contents (DM base)

处理 Treatment	指标 Item	贮存天数 Storage days (t/d)					
		0	30	60	90	130	170
ME	WSC/%	9.53 ± 0.20 Aa	1.94 ± 0.05 Bbc	2.12 ± 0.05 Bb	2.06 ± 0.16 Bbc	1.04 ± 0.09 Bd	1.87 ± 0.09 Bc
	CP/%	10.75 ± 0.26 Aa	0.58 ± 0.05 Abc	0.41 ± 0.05 Ac	0.73 ± 0.10 Ab	0.55 ± 0.05 Abc	0.73 ± 0.05 Bb
PA	WSC/%	9.53 ± 0.20 Aa	3.18 ± 0.25 Ab	2.87 ± 0.14 Ab	3.24 ± 0.27 Ab	2.81 ± 0.09 Ab	2.87 ± 0.33 Ab
	CP/%	10.75 ± 0.26 Aa	0.55 ± 0.10 Acd	0.38 ± 0.05 Ad	0.70 ± 0.00 Ac	0.58 ± 0.05 Acd	2.04 ± 0.05 Ab

不同大写字母表示相同时间不同处理组差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著 ($P < 0.05$). ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组.

Different capital letters indicate significant difference in different treatment groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference at different times in the same treatment group ($P < 0.05$). ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group.

表2 异常毕赤酵母对贮存过程中木质纤维组分含量的动态影响

Table 2 Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on the lignocellulosic constituent contents during storage (DM base)

处理 Treatment	贮存时间 Storage days (t/d)	中性洗涤纤维 (NDF/%)	酸性洗涤纤维 (ADF/%)	酸性洗涤木质素 (ADL/%)	半纤维素 (HC/%)	纤维素 (CL/%)	综纤维素 (HOC/%)	生物降解潜力 (BDP/%)
ME	0	67.67 ± 0.39 Ad	44.01 ± 1.09 Ac	9.94 ± 0.21 Ab	23.66 ± 0.74 Ac	34.06 ± 1.08 Ad	57.72 ± 0.34 Ad	5.81
	30	71.34 ± 0.14 Ac	44.54 ± 0.43 Abc	5.88 ± 0.26 Ae	26.79 ± 0.56 Aa	38.66 ± 0.69 Ac	65.45 ± 0.14 Ab	11.13
	60	71.13 ± 0.25 Ac	45.49 ± 0.09 Ab	10.98 ± 0.84 Aa	25.64 ± 0.22 Ab	34.51 ± 0.90 ABd	60.15 ± 0.77 Ac	5.48
	90	74.52 ± 0.15 Aa	47.40 ± 0.35 Aa	4.64 ± 0.07 Bf	27.12 ± 0.48 Ba	42.75 ± 0.33 Aa	69.88 ± 0.22 Aa	15.06
	130	71.67 ± 0.01 Ac	44.78 ± 0.04 Abc	7.07 ± 0.35 Ad	26.89 ± 0.04 Aa	37.71 ± 0.39 Bc	64.60 ± 0.36 Bb	9.14
	170	72.82 ± 0.53 Ab	48.04 ± 0.53 Aa	8.03 ± 0.07 Bc	24.78 ± 1.06 Bb	40.01 ± 0.46 Ab	64.79 ± 0.59 Ab	8.07
PA	0	67.67 ± 0.39 Ae	44.01 ± 1.09 Aa	9.94 ± 0.21 Ab	23.66 ± 0.74 Ac	34.06 ± 1.08 Ad	57.72 ± 0.34 Af	5.81
	30	69.60 ± 0.83 Bd	42.98 ± 0.05 Bb	5.37 ± 0.08 Bc	26.61 ± 0.13 Ab	37.60 ± 0.03 Bb	64.22 ± 0.16 Bb	11.96
	60	65.22 ± 0.16 Bf	41.42 ± 0.15 Bc	5.62 ± 0.15 Bc	23.80 ± 0.30 Bc	35.79 ± 0.30 Ac	59.60 ± 0.06 Ad	10.60
	90	72.49 ± 0.20 Ba	44.40 ± 0.21 Ba	10.16 ± 0.06 Ab	28.09 ± 0.01 Aa	34.23 ± 0.18 Bd	62.32 ± 0.17 Bc	6.13
	130	70.89 ± 0.16 Bc	44.34 ± 0.28 Aa	5.50 ± 0.04 Bc	26.55 ± 0.12 Bb	38.84 ± 0.24 Aa	65.38 ± 0.12 Aa	11.89
	170	71.59 ± 0.28 Bb	43.56 ± 0.25 Bab	13.23 ± 0.59 Aa	28.03 ± 0.18 Aa	30.33 ± 0.37 Be	58.36 ± 0.53 Be	4.41

不同大写字母表示相同时间不同处理组差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著 ($P < 0.05$). ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组.

Different capital letters indicate significant difference in different treatment groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference in the same treatment group at different times ($P < 0.05$). ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group. NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber; ADL: Acid detergent lignin; CL: Cellulose; HC: Hemicellulose; HOC: Holocellulose; BDP: Biodegradation potential.

性洗涤木质素含量在30、60和130 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$),但在90 d和170 d时又显著高于ME组 ($P < 0.05$),2个试验组中的酸现上升趋势,而PA组则呈现“下降—升高—稳定”趋势,使其酸性洗涤纤维含量显著低于ME组 ($P < 0.05$,除130 d).酸性洗涤木质素含量随时间延长呈现波动变化趋势.另外,ME组和PA组中半纤维素、纤维素和综纤维素含量均随时间延长呈现升高趋势,PA组中半纤维素含量在60 d和130 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$),90 d和170 d时显著高于ME组 ($P < 0.05$);PA组中纤维素和综纤维素含量在30、90和170 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$),130 d时显著高于ME组 ($P < 0.05$),60 d时差异不显著 ($P > 0.05$).ME组和PA组的生物降解潜力均随时间延长呈“上升—下降—上升—下降”的M型变化趋势;导致PA组在30、60和130 d时的生物降解潜力高于ME组,在90 d和170 d时则低于ME组,但总体上看,贮存后秸秆的生物降解潜力均高于原料自身(除个别组),说明混合发酵有利于木质纤维组分的优化重组.

2.4 接种异常毕赤酵母对贮存发酵品质的动态影响

2.4.1 pH值的变化 由图2可知,ME组的pH值随时间延长总体呈现先升高后下降的趋势,130 d时pH值接近于3.95 ($P < 0.05$),而PA组的pH值随时间延长无显著变化 ($P > 0.05$),始终维持在3.8-4.1范围.另一方面,PA组的pH值在30 d时与ME组差异不显著 ($P > 0.05$),但在60-170 d时则显著低于ME组 ($P < 0.05$,除130 d).

2.4.2 发酵品质的变化 由表3可知,ME组中氨态氮/总氮比值随时间延长呈现先下降后稳定的变化趋势,PA组则呈现先增加后减小的趋势;PA组在30 d和170 d时的氨态氮/总氮比值显著低于ME组 ($P < 0.05$),90 d时显著高于ME组 ($P < 0.05$),而在60 d和130 d时差异不显著 ($P > 0.05$).ME组和PA组中乳酸含量随时间延长呈现先升高后下降的趋势,2个试

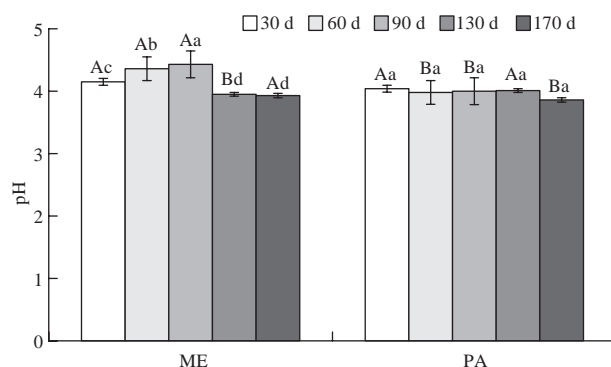


图2 异常毕赤酵母对贮存过程中pH值的动态影响.不同大写字母表示相同时间不同处理组差异显著 ($P < 0.05$);不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著 ($P < 0.05$).ME: 无添加剂对照组;PA: 微生物处理组.
Fig. 2 Dynamic effects of *Pichia anomala* on the pH values during storage. Different capital letters indicate significant difference in different treatment groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference at different times in the same treatment group ($P < 0.05$). ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group.

表3 异常毕赤酵母对贮存发酵过程中小分子有机物含量的动态影响

Table 3 Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on the organic acid contents during storage and fermentation (DM base)

处理组 Treatment	贮存时间 Storage days (t/d)	乳酸 (LA/%)	乙酸 (AA/%)	丙酸 (PPA/%)	丁酸 (BA/%)	乙醇 (EA/%)	氨态氮/总氮 (AN/TN, %)
ME	30	3.78 ± 0.04 Bb	0.77 ± 0.02 Ac	0.10 ± 0.01 Aab	0.25 ± 0.02 Ab	0.71 ± 0.04Aa	2.10 ± 0.19 Aa
	60	5.07 ± 0.03 Ba	1.27 ± 0.05 Bbc	0.08 ± 0.01 Ab	0.20 ± 0.01 Ac	0.67 ± 0.05Bab	1.82 ± 0.25 Aab
	90	3.05 ± 0.02 Bc	1.45 ± 0.09 Bb	0.11 ± 0.02 Aa	0.32 ± 0.02 Aa	0.49 ± 0.02Bc	1.67 ± 0.25 Bbc
	130	2.51 ± 0.02 Bd	1.11 ± 0.07 Abc	0.10 ± 0.00 Aab	0.15 ± 0.01 Ad	0.58 ± 0.05Abc	1.62 ± 0.07 Abc
	170	3.77 ± 0.01 Ab	2.06 ± 0.58 Aa	0.01 ± 0.00 Bc	0.01 ± 0.00 Be	0.56 ± 0.09Ac	1.34 ± 0.09 Ac
PA	30	4.49 ± 0.04 Ab	0.29 ± 0.03 Bc	0.00 ± 0.00 Bc	0.14 ± 0.02 Bbc	0.36 ± 0.05 Bd	1.18 ± 0.25 Bb
	60	5.69 ± 0.02 Aa	1.61 ± 0.01 Aa	0.08 ± 0.00 Ab	0.20 ± 0.04 Aa	1.16 ± 0.03 Aa	2.15 ± 0.26 Aa
	90	3.80 ± 0.01 Ac	1.66 ± 0.07 Aa	0.10 ± 0.02 ABb	0.16 ± 0.02 Bab	0.72 ± 0.02 Ab	1.97 ± 0.01 Aa
	130	2.56 ± 0.03 Ae	1.06 ± 0.05 Ab	0.08 ± 0.00 Bb	0.11 ± 0.00 Bc	0.56 ± 0.01 Ac	1.24 ± 0.10 Ab
	170	3.62 ± 0.01 Bd	1.63 ± 0.15 Aa	0.22 ± 0.05 Aa	0.19 ± 0.01 Aa	0.61 ± 0.06 Ac	0.29 ± 0.01 Bc

不同大写字母表示相同时间不同处理组差异显著 ($P < 0.05$)；不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著 ($P < 0.05$)。ME: 无添加剂对照组；PA: 微生物处理组。

Different capital letters indicate significant difference in different treatment groups at the same time ($P < 0.05$), and Different lowercase letters indicate significant difference at different times in the same treatment group ($P < 0.05$). ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group. LA: Lactic Acid; AA: Acetic acid; PPA: Propionic acid; BA: Butyric acid; EA: Ethanol; AN/TN: Ammonia-nitrogen/total nitrogen.

验组均在60 d时达到各自最高值。PA组中乳酸含量在30-130 d期间显著高于ME组 ($P < 0.05$)，但在170 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$)。2个试验组中乙酸含量随时间延长总体呈现增加趋势，30 d时PA组中的乙酸含量显著低于ME组 ($P < 0.05$)，在60 d和90 d时显著高于ME组 ($P < 0.05$)，130-170 d期间差异不显著 ($P > 0.05$)。从丙酸含量来看，ME组中丙酸含量随时间延长总体呈现先增后减趋势，而PA组则呈现上升趋势；另一方面，PA组中丙酸含量在30 d、90 d和130 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$)，而在170 d时显著高于ME组 ($P < 0.05$)。丁酸是酪酸菌发酵产生的，其含量多寡被认为是青贮发酵失败的重要标志之一^[20]。表3中2个试验组的丁酸含量均低于0.35%，处于良好青贮范围。乙醇则是由青贮发酵过程中的异型乳酸菌和少数酵母菌代谢产生。PA组中乙醇含量在30 d时显著低于ME组 ($P < 0.05$)，60-90 d期间显著高于ME组 ($P < 0.05$)，130-170 d期间差异不显著 ($P > 0.05$)。由表4发酵特性参数可知，混贮170 d期间，ME组和PA组中的挥发性脂肪酸、总有机酸和总小分子有机物含量均随时间延长总体呈现“升高—下降—再升高”的N型变化趋势，但2个试验组中的乳酸/乙酸和乳酸/总有机酸比值则双双呈现下降趋势，其中乳酸/总有机酸比值在90 d后趋于稳定。PA组中乳酸/乙酸比值均高于ME组（除60 d外）；乳酸/总有机酸比值则在30 d时高于ME组，60-170 d期间与ME组相差不大。通过费氏评分法分析，PA组的费氏评分结果总体优于ME组，品质相对较高。

2.5 异常毕赤酵母对贮存过程中细菌群落构成的影响

2.5.1 门类水平细菌群落组成

如图3所示，干玉米秸秆主要以厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 细菌为主，相对丰度分别为65.26%和33.78%。废弃白菜则以变形菌门为主，相对丰度高达80.23%，拟杆菌门 (Bacteroidetes) 次之，丰度为18.57%。二者混贮发酵后演变为以厚壁菌门和变形菌门为主，其中PA组中的厚壁菌门相对丰度在整个贮存期间始终保持在50%以上，ME组中的厚壁菌门细菌在30 d、60 d和170 d时的相对丰度也都高于50%，而变形菌门细菌的丰度在90 d和130 d时高于50%。

2.5.2 属分类水平细菌群落组成

由图4可知，干玉米秸秆附着有肉食杆菌 (*Carnobacterium*)、肠杆菌

(*Enterobacter*)、泛生菌 (*Pantoea*)、农杆菌 (*Yersinia*) 和微小杆菌 (*Exiguobacterium*) 等，相对丰度分别为27.71%、47.10%、10.14%、4.76%和3.46%；废弃白菜中的假单胞菌 (*Pseudomonas*)、泛生菌和黄杆菌 (*Flavobacterium*) 等细菌丰度较高，分别为48.40%、17.10%和16.26%，此外2种原料均附着有少量乳杆菌 (*Lactobacillus*)、乳球菌 (*Lactococcus*) 和肠球菌 (*Enterococcus*)。由此可见，干秸秆原料中自身附着有一定数量的乳酸菌，丰度约29%，而废弃白菜中更多的是与乳酸菌形成营养竞争关系的有害菌，乳酸菌相对丰度

表4 异常毕赤酵母对贮存过程中发酵特性参数的动态影响

Table 4 Dynamic effects of *Pichia anomala* on the fermentation characteristic parameters during storage

处理组 Treatment	贮存时间 Storage days (t/d)	挥发脂肪酸 VFA	总有机酸 TOA	总小分子有机物 TLO	乳酸/乙酸 LA/AA	乳酸/总有机酸 LA/TOA
ME	30	1.11	4.89	5.60	4.91	0.77
	60	1.56	6.63	7.30	3.99	0.76
	90	1.88	4.93	5.43	2.10	0.62
	130	1.36	3.87	4.45	2.26	0.65
	170	2.08	5.85	6.41	1.83	0.64
PA	30	0.43	4.92	5.28	15.48	0.91
	60	1.89	7.58	8.74	3.53	0.75
	90	1.93	5.74	6.46	2.30	0.66
	130	1.25	3.81	4.37	2.42	0.67
	170	2.04	5.66	6.27	2.22	0.64

ME: 无添加剂对照组；PA: 微生物处理组。

ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group. LA/AA: Lactic acid / acetic acid; LA/TOA: Lactic acid / total organic acid; VFA: Volatile fatty acids; TOA: Total organic acids; TLO: Total low molecular weight organics.

表5 异常毕赤酵母对费氏评分的动态影响

Table 5 Dynamic effects of *Pichia anomala* inoculation on the Flieg evaluation

处理组 Treatment	贮存天数 Storage days (t/d)				
	30	60	90	130	170
ME	G (64)	G (78)	Q (45)	Q (52)	G (76)
PA	G (80)	G (76)	G (62)	G (63)	G (61)

ME: 无添加剂对照组；PA: 微生物处理组；G: 好；Q: 合格。括号内为评分。ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group. G: Good; Q: Qualified. The data in the brackets are scores.

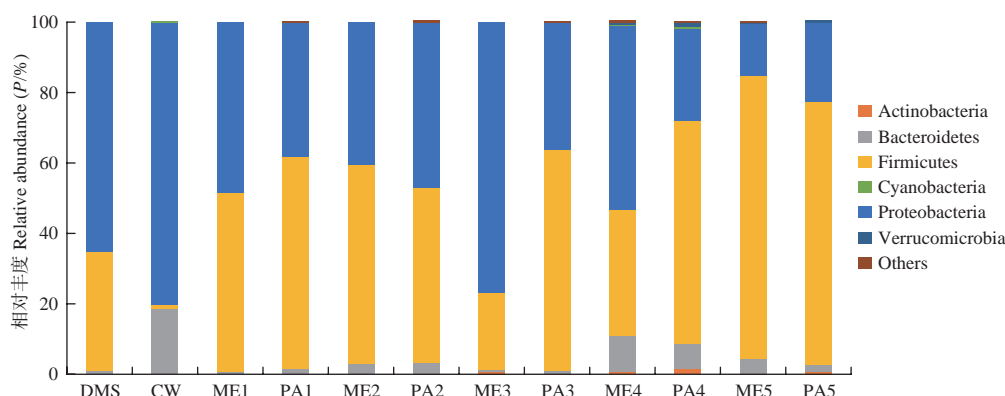


图3 异常毕赤酵母对贮存过程中门水平细菌群落的动态影响. DMS: 干玉米秸秆; CW: 废弃白菜; ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组; 后缀1-5分别表示贮存周期为30、60、90、130、170 d.

Fig. 3 Dynamic effects of *Pichia anomala* on the bacterial community at phylum level during storage. DMS: Dry maize straw; CW: Cabbage waste; ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group; 1-5 represent storage period for 30 d, 60 d, 90 d, 130 d, 170 d, respectively.

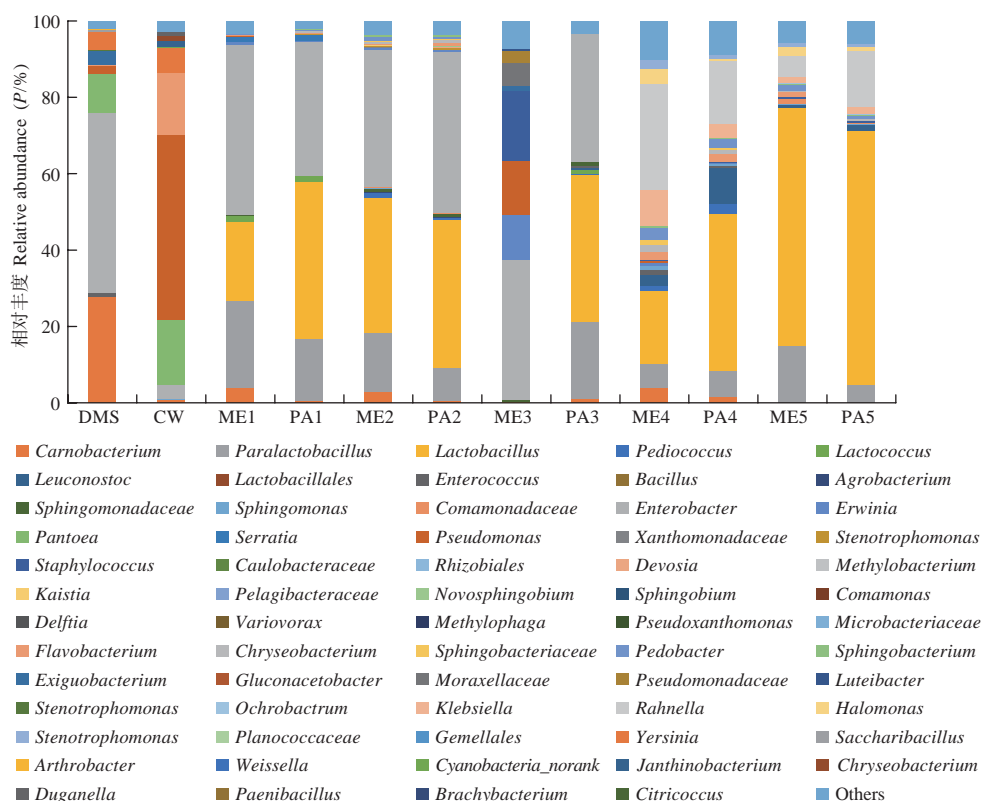


图4 异常毕赤酵母菌剂对贮存过程中属水平细菌群落的动态影响. DMS: 干玉米秸秆; CW: 废弃白菜; ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组; 后缀1-5分别表示贮存周期为30、60、90、130、170 d.

Fig. 4 Dynamic effects of *Pichia anomala* on the bacterial community at genus level during storage. DMS: Dry maize straw; CW: Cabbage waste; ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group; 1-5 represent storage period for 30 d, 60 d, 90 d, 130 d, 170 d, respectively.

不足1%。当2种原料混贮发酵后,随着时间的延长,ME组中有害菌肠杆菌等细菌的相对丰度逐渐下降,肠杆菌在130 d时消失;乳杆菌和类乳杆菌(*Paralactobacillus*)相对丰度呈增加趋势,170 d时二者演变为优势菌,相对丰度分别增至62.10%和15.10%。另一方面,PA组在30-90 d期间主要以乳杆菌和肠杆菌为主,此后细菌种群变得更加丰富,130 d新增了明串珠菌(*Leuconostoc*)、拉恩菌(*Rahnella*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、金黄杆菌

(*Chryseobacterium*)、地杆菌(*Pedobacter*)等;170 d时细菌种类与130 d类似,但乳杆菌相对丰度提高到了66.50%,拉恩菌丰度变为14.60%。

2.5.3 异常毕赤酵母对乳酸菌群多样性的影响 图5为2个试验组中乳酸菌群多样性的分布情况。由图可知,原料秸秆附着的乳酸菌主要以肉食杆菌为主,与废弃白菜混贮发酵后,ME组中类乳杆菌和乳杆菌所占比重较高;且随着贮存时间的延长,乳杆菌比重逐渐提高,类乳杆菌属比重逐渐下

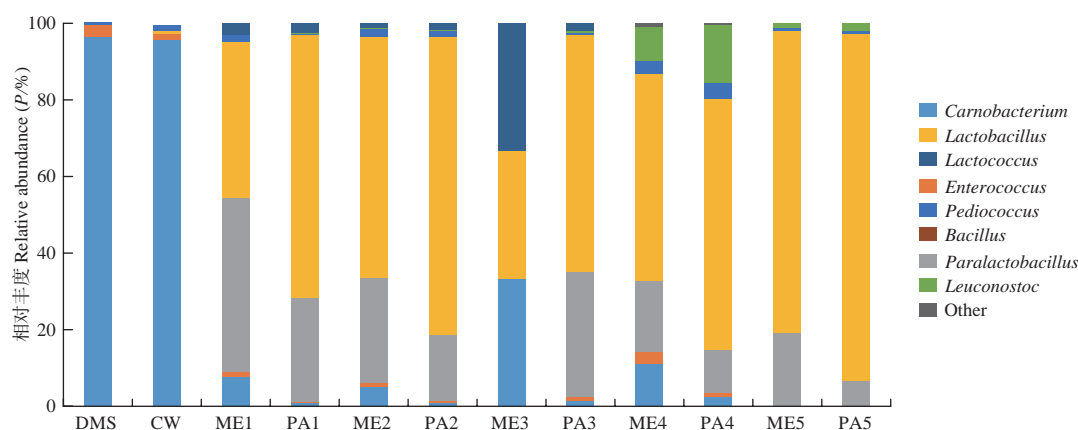


图5 异常毕赤酵母对贮存过程中乳酸菌多样性的动态影响。DMS: 干玉米秸秆; CW: 废弃白菜; ME: 无添加剂对照组; PA: 微生物处理组; 后级1-5分别表示贮存周期为30、60、90、130、170 d。

Fig. 5 Dynamic effects of *Pichia anomala* on the diversity of lactic acid bacteria during storage. DMS: Dry maize straw; CW: Cabbage waste; ME: Additive-free control group; PA: Microbial treatment group; 1-5 represent storage period for 30 d, 60 d, 90 d, 130 d, 170 d, respectively.

降。170 d时ME组中乳杆菌和类乳杆菌之和高达98%。接种异常毕赤酵母的PA组在30 d时优势乳酸菌为乳杆菌, 其比重为68.51%, 类乳杆菌次之(27.17%), 同时还有少量乳球菌、肠球菌、肉食杆菌、片球菌(*Pediococcus*)和明串珠菌; 60 d时PA组中乳杆菌比重增至77.87%, 类乳杆菌比重降至17.30%, 90 d时乳杆菌比重降至61.67%, 类乳杆菌比重升高至32.85%; 130 d乳球菌消失, 乳杆菌比重变为65.61%, 类乳杆菌比重变为11.25%; 170 d时肠球菌和肉食杆菌消失, 乳杆菌比重增至90.72%。

3 讨论

3.1 接种异常毕赤酵母对干物质和有机成分的影响

干物质是生物质原料贮存与转化利用的物质基础, 其含量多寡直接反映贮存期间有机组分的损失量。试验中, PA组干物质含量较ME组显著提高, 说明接种异常毕赤酵母有利于干物质保存, 因为异常毕赤酵母能代谢产生蛋白或糖蛋白毒素等嗜杀因子, 接种后有效抑制或杀死存在的酵母菌和霉菌等腐败微生物, 减少微生物对营养物质的消耗分解, 这与柴长国报道的添加酵母菌能明显提高青贮甜菜茎叶中干物质含量的结果^[21]一致。纤维素和半纤维素等多聚糖是秸秆原料中的重要组分, 木质素是影响生物降解的屏障物质, 较低的木质素含量有利于提高生物降解性能。试验中, 接种*P. anomala*后PA组中的中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量显著下降, 木质素含量在贮存前期也显著降低, 因为*P. anomala*的嗜杀活性与细胞壁组分的水解作用有关^[22]。孙清荣也认为*P. anomala*产生的嗜杀因子具有非常强的 β -1,3-葡聚糖酶活力, 能降解细胞壁主要的多糖类多聚物^[23]。可溶性碳水化合物是乳酸菌等微生物菌群的重要代谢底物, 其含量变化能从侧面反映微生物菌群的繁殖代谢及其活力高低。试验中接种*P. anomala*的PA组显著提高了可溶性碳水化合物含量, 这主要源于*P. anomala*的嗜杀活性和细胞壁分解作用^[24]。总之, 接种异常毕赤酵母对原料干物质保存、木质纤维组分优化重组和提升生物降解潜力具有积极作用。

3.2 接种异常毕赤酵母对贮存发酵品质和发酵特性的影响

pH值是衡量发酵品质优劣的重要指标之一。刘晶晶等认为发酵品质良好的青贮pH值为3.5-4.5^[25]。试验中, PA组贮存170 d期间的pH值始终在3.8-4.1范围内, 且显著低于ME组(除130 d时), 说明接种*P. anomala*能有效抑制霉菌等腐败菌生长繁殖, 使乳酸菌占据繁殖代谢优势; 同时*P. anomala*还与乳酸菌群之间存在代谢产物互利共生机制, *P. anomala*的代谢产物能促进乳酸菌生长和快速产酸^[26], 进而使pH值迅速降低, 为原料长时间贮存提供良好的酸性环境。贮存发酵过程中蛋白质损失主要源于蛋白酶和微生物菌群的分解作用。氨态氮/总氮比值反映了蛋白质的分解程度, 该值越大说明蛋白质和氨基酸的分解程度越高, 贮存质量越差。试验中, ME组和PA组在贮存30 d后的蛋白质含量几乎损失殆尽, 但氨态氮/总氮比值并未大幅增加, 最高值也仅有2.15%, 远低于优良青贮料推荐值10%。这可能是因为粗蛋白在植物蛋白酶与微生物菌群共同作用下先分解为肽氮和游离氨基酸氮, 其中只有极少部分氨基酸进一步降解为氨、有机酸及生物胺等产物。因为当贮存体系pH值低于4.2时蛋白质分解为较稳定的氨基酸, 并不会继续降解为氨等产物^[27], 故出现粗蛋白和氨态氮/总氮值均处于较低值状态。青贮发酵过程中的有机酸和醇等小分子代谢产物也是影响pH和发酵品质评判的重要指标。乳酸是由乳酸菌群消耗可溶性碳水化合物所产生; 乙酸主要由异型发酵乳酸菌分解糖类有机物产生, 有较强的抗真菌能力。试验中, PA组中乳酸含量在130 d之前显著升高, 说明该阶段体系中的乳酸菌群生长繁殖处于活跃状态, 这与图4乳酸菌群丰度和氨态氮/总氮比值(表6)变化趋势一致。170 d时乳酸含量下降的原因可能是乳酸菌丰度下降或乳酸被酵母菌作为代谢底物分解所造成的^[28]。唐振华等也发现甘蔗尾青贮过程中接种热带假丝酵母、枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌复合菌剂能明显提高乳酸含量^[20]。赵拓已证实添加异常毕赤酵母后玉米秸秆与白菜的混贮pH值和乳酸含量指标明显优于植物乳杆菌和布氏乳杆菌这2种乳酸菌添加剂, 但前者在干物质和粗蛋白的保存效果方面略逊于乳酸菌剂^[29]。可

见,异常毕赤酵母与乳酸菌添加剂的作用效果相比存在一定差异,但对品质提升有一定互补作用,这种复合菌剂添加的互补效果如何尚需进一步深入探究.另外,PA组中乙酸含量在30 d时显著下降,而60 d后明显增加,原因可能是由于青贮发酵过程中的乳酸发酵类型从贮存初期的同型发酵逐步向异型发酵转化,这与乳酸/乙酸、乳酸/总有机酸比值变化趋势一致.Kung等认为乳酸/乙酸比值高于3时一般为同型乳酸发酵占主导^[30].可见,接种*P. anomal*能明显提高乳酸含量,优化乙酸等小分子有机物构成模式,改善混贮发酵特性.

3.3 接种异常毕赤酵母对微生物多样性的影响

干玉米秸秆与废弃白菜混贮发酵,本质上是以乳酸菌为优势菌的微生物菌群共生长、共代谢、共发酵的生化反应过程,了解贮存过程中的微生物菌群结构对其发酵品质调控至关重要.高通量测序技术能全面准确描述微生物群落和微生态信息,特别是低丰度物种的变化,已被用于苜蓿、玉米等青贮中的微生物检测^[31-32].胡宗福等发现全株玉米青贮期间主要包含乳杆菌、芽孢乳杆菌、黄杆菌和克雷伯氏菌等细菌^[33].Li等发现加入微藻会影响五节芒青贮过程中的微生物菌群,主要菌群由肠球菌、乳球菌和拟杆菌等细菌演变成乳杆菌和肠杆菌^[34].陶莲等发现玉米秸秆青贮45 d期间,主要菌群由魏斯氏菌、鞘氨醇菌和*Swaminathania*演变成片球菌、魏斯氏菌和乳杆菌属^[35].Ni等发现联合添加乳酸菌和糖蜜增加了大豆青贮中的乳杆菌丰度,并减少梭菌和肠杆菌等腐败菌丰度^[36].本试验混贮发酵过程中主要有乳杆菌、类乳杆菌和肠杆菌等细菌,同时还有少量黄杆菌、地杆菌、欧文氏菌和克雷伯氏菌等杂菌;接种*P. anomal*后,属水平优势细菌种群演变成以乳杆菌和肠杆菌为主,且黄杆菌、地杆菌、欧文氏菌等细菌种类及其丰度明显减少.说明接种*P. anomal*对黄杆菌、地杆菌等杂细菌的嗜杀或抑制效果较好,这些杂细菌对*P. anomal*产生的嗜杀因子高度敏感^[22].另一方面,接种*P. anomal*的PA组中乳酸细菌多样性变得更加丰富,但仍以耐酸能力较强的乳杆菌和类乳杆菌为主要菌群,肉食杆菌、肠球菌、片球菌、明串珠菌和乳球菌等丰度相对较低,这与其他青贮报道中的乳酸菌群构成^[37]基本一致.另外,郝薇等认为短小杆菌、芽孢杆菌、微杆菌、假单胞菌、类芽孢杆菌、乳杆菌、肠球菌及片球菌等细菌均能产生蛋白酶并使蛋白质降解^[38].本试验中存在有一定的上述蛋白质分解菌,这也可能是导致2个试验组中粗蛋白含量发生明显下降的原因.可见,混贮发酵过程中微生物菌群的变化与主要有机组分的优化重组密切相关.

4 结论

利用青贮原理将干玉米秸秆与白菜废弃物混贮发酵170 d仍能保持干秸秆不变质,接种异常毕赤酵母更有利于减少原料中干物质、粗蛋白和可溶性碳水化合物等能量组分损失,使中性洗涤纤维与酸性洗涤纤维含量显著下降,有机组分得到优化重组,同时提高了乳酸含量和乳酸发酵强度,改善了贮存品质.可见,异常毕赤酵母用作干秸秆与尾菜混合贮存的接菌剂是可行的,这对干黄秸秆的贮存具有很好的指导意义.

参考文献 [References]

- Franc RT, Buffiere P, Bayard R. Ensiling for biogas production: critical parameters. a review [J]. *Biomass Bioenergy*, 2016, **94**: 94-104
- Agneessens L, Viaene J, Vanden Nest T, Vandecasteele B, De Neve S. Effect of ensiled vegetable crop residue amendments on soil carbon and nitrogen dynamics [J]. *Sci Hort*, 2015, **192**: 311-319
- Cao Y, Cai Y, Takahashi T, Yoshida N, Tohno M, Uegaki R, Nonaka K, Terada F. Effect of lactic acid bacteria inoculant and beet pulp addition on fermentation characteristics and in vitro ruminal digestion of vegetable residue silage [J]. *J Dairy Sci*, 2011, **94** (8): 3902-3912
- 任海伟,王聪,马延琴,李志忠,范文广,王昱,张丙云,秦州州,余倩倩.接种不同乳酸菌对干玉米秸秆与白菜废弃物混贮品质的影响[J].应用与环境生物学报,2018, **24** (3): 547-556 [Ren HW, Wang C, Ma YQ, Li ZZ, Fan WG, Wang Y, Zhang BY, Qin ZZ, Yu QQ. Effects of inoculating different lactic acid bacteria on the mixed storage quality of dry maize straw and cabbage waste [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (3): 547-556]
- Sun ZH, Liu SM, Tayo GO, Tang SX, Tan ZL, Lin B, He ZX, Hang XF, Zhou ZS, Wang M. Effects of cellulase or lactic acid bacteria on silage fermentation and in vitro gas production of several morphological fractions of maize stover [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2009, **152** (3): 219-231
- Li XX, Xu WB, Yang JS, Zhao HB, Pan CF, Ding X, Zhang YG. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw [J]. *Anim Nutr*, 2016, **2** (3): 229-233
- Acosta AY, Jatkauskas J, Vrotniakiene V. The effect of a silage inoculant on silage quality, aerobic stability, and meat production on farm scale [J]. *Isrn Vet Sci*, 2012, **2** (4): 337-342
- Muck RE, Nadeau EMG, Mcallister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung JL. Silage review: recent advances and future uses of silage additives [J]. *J Dairy Sci*, 2018, **101** (5): 3980-4000
- 王凤林,张莉娟,孟媛,袁昕昕,袁军涛,李书巧,温荣辉.不同比例微生物组合对玉米秸秆青贮品质的影响[J].基因组学与应用生物学,2017, **36** (11): 4701 - 4706 [Wang FL, Zhang LJ, Meng Y, Yuan XX, Yuan JT, Li SQ, Wen RH. Effect of different proportion of microbial inoculants on quality of corn stover silage [J]. *Genom Appl Biol*, 2017, **36** (11): 4701-4706]
- 李红亚,李文,李术娜,王树香,李猛,田苗苗,朱宝成.解淀粉芽孢杆菌复合菌剂对玉米秸秆的降解作用及表征[J].草业学报,2017, **26** (6): 153-167 [Li HY, Li W, Li SN, Wang SX, Li M, Tian MM, Zhu BC. Analysis of the degradation of corn stalk fermented by complex bacteria composed of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains [J]. *Acta Pratacult Sin*, 2017, **26** (6): 153-167]
- Fily I, Sucu E, Karabulut A. The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages [J]. *J Ind Microbi Biotechnol*, 2006, **33** (5): 353-358
- 唐振华,王波,邹彩霞,夏中生,梁辛,韦升菊,梁贤威.不同微生物添加剂组合对甘蔗尾青贮品质影响[J].饲料工业,2016, **37** (1): 32-37 [Tang ZH, Wang B, Zou CX, Xia ZS, Liang X, Wei SJ, Liang XW. Effect of microbial inoculants on quality of sugarcane tops silage [J]. *Feed Ind*, 2016, **37** (1): 32-37]
- 孙怀永.异常毕赤酵母(*Pichia anomala*) HN1-2菌株产单细胞蛋白和嗜杀因子的研究[D].山东:中国海洋大学,2012 [Sun HY. Research of simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Pichia Anomala* HN1-2 [D]. Shandong: Ocean University of China, 2012]

- 14 Boysen ME, Bjorneholm S, Schnurer J. Effect of the biocontrol yeast *Pichia anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum*, and *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply [J]. *Posth Biol Technol*, 2000, **19** (2): 173-179
- 15 Olstorpe M, Borling S, Schnürer J, Passoth V. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm condition [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2010, **156** (1): 47-56
- 16 Coda R, Cassone A, Rizzello CG, Nionelli L, Cardinali G, Gobetti M. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during souring storage of wheat bread [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77** (10): 3484-3492
- 17 唐洁, 王海燕, 徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混株发酵对白酒液态发酵效率和风味物质的影响[J]. 微生物学通报, 2012, **39** (7): 921-930 [Tang J, Wang HY, Xu Y. Effect of mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* on fermentation efficiency and flavor compounds in Chinese Liquor [J]. *Microbiol Chin*, 2012, **39** (7): 921-930]
- 18 冯骁骋, 曾洁, 李伟军, 高静, 王志军. 天然草原牧草青贮饲料评级体系进展研究[J]. 草原与草业, 2016, **28** (1): 48-52 [Feng XC, Ceng J, Li WJ, Gao J, Wang ZJ. Study on progress of grading system for natural grassland silage [J]. *Grassl Pratacult*, 2016, **28** (1): 48-52]
- 19 许颖, 马德胜, 宋文枫, 魏小芳. 采用16S rDNA高通量测序技术分析油藏微生物多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22** (3): 409-414 [Xu Y, Ma DS, Song WF, Wei XF. 16S rDNA-assisted high-throughput sequencing analysis of microbial diversity in oil reservoirs [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, **22** (3): 409-414]
- 20 唐振华, 陈月丽, 邹彩霞, 夏中生, 梁辛, 韦升菊, 李丽莉, 梁贤威. 热带假丝酵母、枯草芽孢杆菌与乳酸菌组合对甘蔗尾青贮品质和有氧稳定性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2015, **42** (12): 3217-3225 [Tang ZH, Chen YL, Zou CX, Xia ZS, Liang X, Wei SJ, Li LL, Liang XW. Effect of *Candida tropicalis*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* combination on quality and aerobic stability of sugarcane tops silage [J]. *Chin Anim Husb Veter Med*, 2015, **42** (12): 3217-3225]
- 21 柴长国. 饲用甜菜茎叶发酵效果研究[J]. 草业科学, 2006, **23** (7): 70-72 [Chai CG. Research of fermenting effects on fodder beet leaves quality [J]. *Pratacult Sci*, 2006, **23** (7): 70-72]
- 22 王祥红, 贾仁洁, 李静, 池振明. 嗜杀酵母的生物学功能及其应用[J]. 生物技术通报, 2013, **4**: 33-38 [Wang XH, Jia RJ, Li J, Chi ZM. Character and application of killer yeast [J]. *Biotechnol Bull*, 2013, **4**: 33-38]
- 23 孙清荣. 产嗜杀因子海洋酵母多样性的初步研究[D]. 山东: 中国海洋大学, 2010 [Sun QR. Primary study on the diversity of marine Killer yeasts [D]. Shandong: Ocean University of China, 2010]
- 24 王祥红. 海洋嗜杀酵母的筛选、嗜杀因子的纯化及其基因的克隆[D]. 山东: 中国海洋大学, 2007 [Wang XH. Screening for the marine killer yeast against pathogenic yeast in a crab, purification of the killer toxin and cloning of the killer toxin gene from the marine killer yeast YF07b [D]. Shandong: Ocean University of China, 2007]
- 25 刘晶晶, 高丽娟, 师建芳, 王小芬, 袁旭峰, 崔宗均. 乳酸菌复合系和植物乳杆菌提高柳枝稷青贮效果[J]. 农业工程学报, 2015, **31** (9): 295-302 [Liu JJ, Gao LJ, Shi JF, Wang XF, Yuan XF, Cui CJ. *Lactic acid bacteria* community and *Lactobacillus Plantarum* improving silaging effect of switchgrass [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2015, **31** (9): 295-302]
- 26 Schnürer J, Jonsson A. *Pichia anomala*, J121: a 30-year overnight near success biopreservation story [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, **99** (1): 5-1
- 27 贾晶霞, 梁宝忠, 王艳红, 赵永亮, 李建成. 不同汽爆预处理对干玉米秸秆青贮效果的影响[J]. 农业工程学报, 2013, **29** (20): 192-198 [Jia JX, Liang BZ, Wang YH, Zhao YL, Li JZ. Effect of steam explosion pretreatment on ensiling performance of dry corn stover [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2013, **29** (20): 192-198]
- 28 段小果, 李博, 贺银凤. 乳酸菌与酵母菌共生机理的研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, **44** (8): 1988-1995 [Duan XG, Li B, He YF. Progress in symbiotic mechanism between lactic acid bacteria and yeast [J]. *Microbiol China*, 2017, **44** (8): 1988-1995]
- 29 赵拓. 添加剂对玉米秸秆与白菜混贮品质影响及细菌多样性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016 [Zhao T. Effects of microbial additives on the mixed-silage quality for corn stover and cabbage waste and bacterial diversity [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2016]
- 30 Kung LJ, Ranjit NK. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage [J]. *J Dairy Sci*, 2001, **84** (5): 1149-1155
- 31 熊乙, 赵燕梅, 许庆方, 玉柱, 郭继承, 冯富, 李凯凯. 五个地区玉米青贮菌群多样性的研究[J]. 草业与畜牧, 2017 (5): 16-22 [Xiong Y, Zhao YM, Xu QF, Yu Z, Guo JC, Feng F, Li KK. Study on the microbial diversity of corn silage in five regions [J]. *Pratacult Anim Husb*, 2017 (5): 16-22]
- 32 Ogunade IM, Jiang Y, Pech AC, Kim DH, Oliveira AS, Vyas D, Weinberg ZG, Jeong KC, Adesogan AT. Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: effects of *Escherichia coli* O157: H7 and silage additives [J]. *J Dairy Sci*, 2018, **101** (3): 1-12
- 33 胡宗福, 常杰, 萨仁呼, 王思珍, 牛化欣. 基于宏基因组学技术检测全株玉米青贮期间和暴露空气后的微生物多样性[J]. 动物营养学报, 2017, **29** (10): 3750-3760 [Hu ZF, Chang J, Sarnhu, Wang SZ, Niu HX. Microbial diversity of whole-plant maize during ensilage and after air exposure analyzed by metagenomics technology [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2017, **29** (10): 1-11]
- 34 Li L, Sun Y, Yuan Z, Kong X, Wao Y, Yang L, Zhang Y, Li D. Effect of microalgae supplementation on the silage quality and anaerobic digestion performance of Manyflower silvergrass [J]. *Bioresour Technol*, 2015, **189** (10): 334-340
- 35 陶莲, 刁其玉. 青贮发酵对玉米秸秆品质及菌群构成的影响[J]. 动物营养学报, 2016, **28** (1): 198-207 [Tao L, Diao QY. Effects of ensiling on quality and bacteria composition of corn stalk [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2016, **28** (1): 198-207]
- 36 Ni KK, Wang FF, Zhu BG, Yang JX, Zhou GA, Pan Y, Tao Y. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage [J]. *Bioresour Technol*, 2017, **238**: 706-715
- 37 许冬梅, 张萍, 柯文灿, 郭旭生. 青贮微生物及其对青贮饲料发酵品质影响的研究进展[J]. 草地学报, 2017, **25** (3): 460-465 [Xu DM, Zhang P, Ke WC, Guo XS. Research process in silage microorganism and its effects on silage quality [J]. *Acta Agrest Sin*, 2017, **25** (3): 460-465]
- 38 郝薇. TMR发酵过程中微生物及其蛋白酶对蛋白降解的作用机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015 [Hao W. Mechanism of protein degradation by microorganisms and proteinases during fermentation of total mixed ration [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015]