

DOI: 10.11686/cyxb2017286

http://cyxb.magtech.com.cn

任海伟, 刘菲菲, 王莉, 等. 添加纤维素酶对干玉米秸秆与白菜废弃物混贮品质的影响. 草业学报, 2018, 27(6): 158-167.

Ren H W, Liu F F, Wang L, et al. Effect of cellulase addition on the quality of dried corn straw and cabbage residue mix silage. Acta Prataculturae Sinica, 2018, 27(6): 158-167.

添加纤维素酶对干玉米秸秆与白菜 废弃物混贮品质的影响

任海伟^{1,2,3}, 刘菲菲¹, 王莉¹, 李志忠^{1*}, 王昱^{2,3}, 孙安琪¹,
沈佳莉¹, 孙文斌¹, 余倩倩⁴

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州理工大学西部能源与环境研究中心, 甘肃 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, 甘肃 兰州 730050; 4. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:将干玉米秸秆(DCS)与废弃白菜(CW)混合发酵贮存,研究了纤维素酶添加量对混贮品质及微生物多样性的影响。设置对照 ME 组(无酶添加)、CA 组(酶添加量 0.1%)和 CB 组(酶添加量 0.3%)3 个处理组,密封贮存 60 d,间隔 30 d 分析其化学组分、发酵品质和微生物多样性。结果表明,贮存 30 d 时 CA 与 CB 组中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和纤维素(CL)均显著低于 ME 组($P < 0.05$),乳酸(LA)和可溶性碳水化合物(WSC)含量显著高于 ME 组($P < 0.05$),pH 和氨氮/总氮(AN/TN)显著低于 ME 组($P < 0.05$);60 d 时 3 个处理组的乳酸/乙酸(LA/AA)值均高于 3,乳酸/总有机酸(LA/TOA)值均高于 0.6,其中 CB 组乳酸发酵强度最好。Miseq 高通量测序分析发现,3 个处理组在贮存 60 d 期间门水平优势类群为厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria),属水平优势类群为类乳杆菌属(*Paralactobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)。腐败菌(e.g. *Enterobacter*)丰度随时间延长逐渐下降,*Paralactobacillus* 和 *Lactobacillus* 丰度逐渐升高,纤维素酶有助于提高乳酸细菌丰度并使腐败细菌丰度下降,强化乳酸发酵。总之,低剂量纤维素酶有助于保存半纤维素(HC)、纤维素(CL)和可溶性碳水化合物(WSC)等组分,且发酵品质良好;高剂量纤维素酶能进一步强化乳酸发酵。综合考虑酶成本与贮存效果,推荐低剂量纤维素酶(0.1%)用于干秸秆和白菜废弃物的混合贮存。

关键词:干玉米秸秆;白菜废弃物;纤维素酶;混合贮存品质;微生物多样性

*Effect of cellulase addition on the quality of dried corn straw and cabbage residue mix silage

REN Hai-wei^{1,2,3}, LIU Fei-fei¹, WANG Li¹, LI Zhi-zhong^{1*}, WANG Yu^{2,3}, SUN An-qi¹, SHEN Jia-li¹, SUN Wen-bin¹, YU Qian-qian⁴

1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. China Western Energy & Environment Research Center, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 3. Key Laboratory of Complementary Energy System of Biomass and Solar Energy, Lanzhou 730050, China; 4. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Dry corn straw (DCS) and cabbage waste (CW) were mixed and ensiled trans-seasonally; the effect of cellulase addition on silage quality and microbial community diversity were assessed. Three treatments were

* 收稿日期:2017-06-26;改回日期:2017-09-28

基金项目:国家自然科学基金(51366009,51666010),甘肃省自然科学基金项目(1606RJZA206,1606RJYA287,1606RJZA196),兰州市科技计划项目(2014-2-20),甘肃省高校科研项目(2016A-001)和兰州理工大学博士科研启动费(061703)资助。

作者简介:任海伟(1983-),男,山西孝义人,副教授,博士。E-mail:rhw52571119@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail:zzli2004@lut.cn

compared; a control (ME) (no cellulase), 0.1% cellulase (CA) and 0.3% cellulase (CB). All silages were ensiled for 60 days in airtight containers. Chemical composition and fermentation quality were measured over a 30 day period. Microbial community diversity was analyzed using Miseq high-throughput sequencing technologies. The results showed that neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and cellulose (CL) in groups CA and CB were significantly lower than ME after 30 days ($P < 0.05$); pH and ammonia nitrogen to total nitrogen ratio (AN/TN) were also significantly lower than ME after 30 days ($P < 0.05$). Lactic acid (LA) and water soluble carbohydrates (WSC) were significantly higher than the ME treatment ($P < 0.05$). Lactic acid to acetic acid ratio's (LA/AA) were greater than 3 and LA to total organic acid ratio's (LA/TOA) were greater than 0.6 for all treatments after 60 days, but fermentation intensity was highest in the CB treatment. The microbial community diversity results showed that Firmicutes and Proteobacteria were dominant at the phylum level, the dominant microflora at the genus level were *Paralactobacillus*, *Lactobacillus* and *Enterobacter*. Over time, the abundance of *Enterobacter* gradually decreased and the abundance of *Paralactobacillus* and *Lactobacillus* increased, which indicated that the addition of cellulase improved the abundance of lactic acid bacteria and reduced the abundance of spoilage bacteria. It was concluded that low cellulase (0.1%) was the most appropriate application rate; it was conducive to the preservation of hemicellulose (HC), CL and WSC and improved fermentation quality.

Key words: dry corn straw; cabbage waste; cellulase; mixed storage quality; microbial community diversity

作物秸秆是常用的饲草和能源作物,但由于我国农村耕作条件和习惯等因素,秸秆多数在萎蔫干黄后才收获,导致水分和糖分等养分大量流失,甚至高度纤维化,直接贮存不利于后期动物消化和能源转化。以青贮为代表的湿法贮存技术为干黄秸秆贮存提供了思路,诸多学者将干秸秆与花椰菜^[1]、马铃薯渣^[2]、玉米粉浆^[3]等物料混合贮存并获得良好品质,减少了有机营养物质损失;但由于干秸秆自身营养物质所限,与其混合的原料必须满足高水分(65%~75%)、高糖分等特点,造成干秸秆贮存的局限性。本课题组前期也发现干秸秆与白菜、莴笋叶等尾菜能混贮 50~60 d,但为了更好地保存营养物质,混贮品质仍需进一步改善^[4-5]。

研究表明,青贮过程中加入适宜添加剂能提高贮存品质并延长贮存周期。纤维素酶是常用的青贮添加剂,能将植物细胞壁成分降解为可溶性糖,为乳酸菌发酵提供碳源,有效改善贮存品质。陶莲等^[6]认为添加纤维素酶能提高华北驼绒藜(*Ceratoides arborescens*)青贮料的乳酸含量,降低 pH 值、氨态氮和丁酸含量,改善发酵品质。陈鑫珠等^[7]认为纤维素酶能显著降低象草(*Pennisetum purpureum*)和甜玉米(*Zea mays*)秸秆混贮料的中性洗涤纤维含量,提高乳酸含量。赵政等^[8]发现玉米秸秆青贮中添加 0.3% 纤维素酶的贮存效果最佳,腐败率低于 1.4%,有效降低了青贮腐败率,提高了营养价值。Selmer-olsen^[9]报道用纤维素酶处理的梯牧草(*Phleum pratense*)、牛毛草(*Eleocharis yokoscensis*)和红三叶草(*Trifolium pratense*)混合青贮,显著降低了青贮 pH,增加了乳酸及水溶性碳水化合物含量,明显改善了青贮品质。然而,尚未见有关纤维素酶应用于秸秆/白菜混合贮存过程的文献报道。

青贮品质的优劣归根结底是微生物菌群代谢共同作用的结果。青贮中微生物多样性的研究方法主要有 16S rRNA 鉴定、PCR-DGGE 技术及高通量测序技术等,其中高通量测序技术准确性高、灵敏度高、成本低,能更全面、准确描述微生物群落信息^[10],但高通量测序技术用于青贮中微生物菌群研究的文献报道还不多,仅有少数学者进行了报道。Li 等^[11]利用 MiSeqPE 300 平台发现加入微藻会影响五节芒青贮过程中的微生物菌群,优势乳酸菌由原先 *Enterococcus* 变为 *Lactobacillus*, *Enterococcus* 和 *Lactococcus* 的丰度也分别从 10.08% 和 57.00% 下降至 2.30% 和 0.79%。陶莲等^[12]用 Miseq 测序技术分析青贮前后玉米秸秆的菌群结构变化,发现青贮后饲料的发酵品质良好,其中厚壁菌门(Firmicutes)、片球菌属(*Pediococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)的菌群丰度显著增加($P < 0.05$)。而有关高通量测序用于秸秆与白菜废弃物混贮过程中的微生物菌群分析尚未见报道。

为进一步改善干玉米秸秆和废弃白菜的混合贮存品质,拟从感官品质、化学组分和发酵品质等方面研究添加不同剂量纤维素酶对二者混贮品质影响,并通过高通量测序考察贮存过程中的微生物多样性,尤其是乳酸细菌类群的变化情况,筛选适宜的纤维素酶添加量,以期干玉米秸秆与白菜混贮模式的技术推广提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

干玉米秸秆(dry corn straw,DCS)取自甘肃省定西市陇西县,摘穗并在田间留置一段时间后收集、粉碎至1~2 cm,含水量为10.23%;白菜废弃物(cabbage waste,CW)收集自兰州市七里河区职工菜市场,含水量为91.41%,切成2 cm×2 cm备用。

纤维素酶(酶活力为10万U·g⁻¹)购自宁夏和氏璧生物技术有限公司。

DNA试剂盒采用Water DNA Isolation Kit,购自成都福际生物技术有限公司。

1.2 试验仪器和设备

纤维测定仪(F800,山东海能科技有限公司);GC9790II气相色谱仪(浙江福立分析仪器有限公司);紫外分光光度计(752N,上海仪电分析仪器有限公司);电泳仪(DYY-11,北京市六一仪器厂);PCR仪(MG96+,杭州朗基科学仪器有限公司);微型台式高速离心机(TG16-W,湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

表1 干玉米秸秆和废弃白菜的化学成分

Table 1 Chemical compositions of dry corn straw (DCS) and cabbage waste (CW)

青贮原料 Ensilage materials	干物质含量 Dry matter (DM, % FW)	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, % DM)	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, % DM)	酸性洗涤木质素 Acid detergent lignin (ADL, % DM)	纤维素 Cellulose (CL, % DM)	半纤维素 Hemicellulose (HC, % DM)	可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates (WSC, % DM)
废弃白菜 Cabbage waste (CW)	8.59±0.15	36.25±1.20	33.27±0.97	16.21±0.45	17.06±0.64	2.98±0.46	8.05±0.03
干玉米秸秆 Dry corn straw (DCS)	89.77±0.01	76.85±0.02	47.15±0.01	8.12±0.03	39.03±0.02	29.70±0.02	14.57±0.02

1.3 试验设计与原料混贮制作

根据课题组前期试验基础^[4],准确称取3.23 kg干玉米秸秆和9.87 kg废弃白菜,充分混匀后均匀喷洒事先配制好的纤维素酶液,对照组喷洒相同体积的蒸馏水,使贮存体系中含水量为73%。试验设置低剂量CA组(酶添加量0.1%)、高剂量CB组(酶添加量0.3%)和无酶添加的对照组(ME组)3个处理组,每个处理组3个平行,17℃恒温密封贮存于红泥青贮袋中,连续贮存60 d(2015年1~3月),间隔30 d进行感官评定、化学组分、发酵品质和细菌多样性分析。

1.4 样品处理

准确称取2份有代表性的混贮料200 g,其中1份取20 g按1:9加蒸馏水打浆,依次通过4层纱布和定性滤纸过滤,3900 r·min⁻¹离心10 min,所得浸提液测定pH值后-20℃冷冻保存,用于乳酸、乙酸、丙酸等有机酸和氨态氮的测定。另一份样品用于木质纤维等有机组分分析。

1.5 分析方法

1.5.1 感官评价 现场感官评价参照德国农业协会评分法,优良(1级)为15~20分,尚好(2级)为10~15分,中等(3级)为4~10分,腐败(4级)为0~4分^[13]。

1.5.2 化学成分分析 干物质含量(DM)采用105℃烘干法。中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和酸性洗涤木质素(ADL)测定采用纤维测定仪^[4]。纤维素(CL)、半纤维素(HC)和综纤维素(holocellulose, HoC)含量通过公式计算获得,CL=ADF-ADL,HC=NDF-ADF, HoC=CL+HC。可溶性碳水化合物(WSC)测定采用蒽酮硫酸比色法^[4]。

1.5.3 发酵品质分析 pH 值测定采用 PHS-3D 型 pH 计。氨态氮(ammonia nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$)测定采用苯酚一次氯酸钠比色法。乳酸含量测定采用山东省科学院 SBA-40X 生物传感器。乙酸、丙酸及丁酸等挥发酸含量测定采用气相色谱法,进样口温度 200 °C,载气为高纯氮气(99.999%),不分流进样,升温程序:40 °C 保持 2 min,以 2 °C · min⁻¹升至 100 °C 后保持 5 min,再以 10 °C · min⁻¹升至 200 °C,保持 5 min。总有机酸包括乳酸、乙酸、丙酸和丁酸等。发酵品质采用 V-score 评分法,满分为 100 分,80 分以上为良好,60~80 分为尚可,60 分以下为不良^[13]。

1.5.4 细菌多样性分析 无菌环境下称取 60 g 贮存样品均分成 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 平台进行测序。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。

1.6 数据分析

用 Excel 2007 软件处理基础数据,用 SPSS 18.0 对试验结果进行数据统计分析,各处理数据间用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 贮存期间主要有机化学组分的变化

2.1.1 纤维素酶对木质纤维组分的影响 由表 2 可知,随着贮存时间延长,ME 组中 CL、HoC 及 NDF 含量均呈上升趋势,CA 和 CB 组中 ADF、NDF 及 ADL 则呈下降趋势,HC 含量呈上升趋势。30 d 和 60 d 时,添加纤维素酶的 CA 和 CB 组中 CL、ADF 及 NDF 含量均显著低于 ME 组($P < 0.05$);30 d 时 CA 和 CB 组中的 HC、ADL 含量与 ME 组差异不显著($P > 0.05$),且 HoC 含量显著低于 ME 组($P < 0.05$);60 d 时 CA 组中 ADL 含量显著低于 ME 和 CB 组($P < 0.05$),CB 组中 HoC 含量显著低于 ME 和 CA 组($P < 0.05$)。

表 2 混贮过程中木质纤维组分的变化

Table 2 Changes of chemical composition during silage (% DM)

处理组 Treatment	对照 ME			CA (Dose of 0.1%)			CB (Dose of 0.3%)		
	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d
纤维素 Cellulose (CL)	34.06Ba	38.80Aa	37.67Aa	34.06Ba	36.38Ab	32.95Bb	34.06Aa	32.64Ac	27.28Bb
半纤维素 Hemicellulose (HC)	23.66Ba	25.89Aa	25.37ABc	23.66Ba	24.49Ba	29.62Aa	23.66Ba	24.03Ba	28.02Ab
综纤维素 Holocellulose (HoC)	57.72Ba	64.73Aa	63.05Aa	57.72Ba	60.86Ab	62.56Aa	57.72Aa	56.66Ac	57.30Ab
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF)	44.01Aa	45.45Aa	44.42Aa	44.01Aa	42.07Ab	36.22Bb	44.01Aa	39.84Bc	34.94Cb
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (ND)	67.67Ba	71.34Aa	71.13Aa	67.67Aa	66.56Bb	64.84Cb	67.67Aa	63.86Bc	62.94Cc
酸性洗涤木质素 Acid detergent lignin (ADL)	9.95Aa	6.61Bab	6.75Ba	9.95Aa	5.69Bb	3.28Cb	9.95Aa	7.20Ba	5.66Ba

注:同行不同小写字母表示相同处理时间不同处理组差异显著($P < 0.05$),同行不同大写字母表示相同处理组不同处理时间差异显著($P < 0.05$)。

Note: The same line with different lowercase indicate significant difference at $P < 0.05$ among different groups at the same treatment time, the same line with different capital letters indicate significant difference at $P < 0.05$ for the same groups within different treatment time.

2.1.2 纤维素酶对碳水化合物(WSC)和粗蛋白(CP)的影响 由表 3 可知,随着时间延长,3 个处理组中 CP 含量呈快速下降趋势,蛋白组分损失严重;贮存 30 d 时 3 个处理组之间 CP 含量差异不显著($P > 0.05$),60 d 时 CA 和 CB 组显著高于 ME 组,但 CA 和 CB 组之间差异不显著($P > 0.05$)。另一方面,3 个处理组中 WSC 含量随贮存时间的延长而呈显著下降趋势。30 d 时 CA 和 CB 组中 WSC 含量显著高于 ME 组($P < 0.05$),且 CB 组最高;60 d 时 CA 组的 WSC 含量显著高于 ME 组($P < 0.05$),但 CB 组分别与 ME、CA 组之间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 纤维素酶对发酵品质的影响

由表 4 可知,与 ME 组相比,CA 和 CB 组 pH 值下降速度明显提升,其中高剂量 CB 组 pH 下降速度最快,且 CA 和 CB 组在贮存期间的 pH 始终介于 3.90~4.10;30 d 时 CA 和 CB 组的 pH 值差异显著 ($P<0.05$),但 60 d 时差异不显著 ($P>0.05$)。试验中 30 d 时高剂量 CB 组中 LA 含量显著高于 ME 组 ($P<0.05$),60 d 时无论纤维素酶剂量高低均能促进 LA 含量显著增加 ($P<0.05$)。AA 含量亦随时间延长而显著提高,60 d 时 CB 组 AA 含量显著低于 ME 和 CA 组 ($P<0.05$)。3 个处理组中 PPA 和 BA 含量均处于较低值,尤其 BA 含量远低于优良青贮推荐值 1%。CA 组中 EA 含量随贮存时间延长呈显著增加趋势 ($P<0.05$),ME 和 CB 组则变化不显著 ($P>0.05$);30 d 时 CA 组与 CB 组中 EA 含量显著低于 ME 组 ($P<0.05$),60 d 时差异不显著 ($P>0.05$)。另外,3 个处理组中 LA/AA 值均高于 3,LA/TOA 值也均在 0.7 以上,其中 CB 组的 LA/AA 和 LA/TOA 均为最高值,说明纤维素酶的添加有助于强化乳酸发酵强度,且高剂量更有利于促进乳酸发酵。CA 和 CB 组均显著降低了 AN/TN 值,且二者之间差异不显著 ($P>0.05$),说明纤维素酶的添加减少了蛋白质损失。

表 3 混贮过程中 WSC 和 CP 组分的变化

Table 3 Changes of WSC and CP during silage

处理组	时间	可溶性碳水化合物	粗蛋白
Treatment	Time	Water soluble carbohydrates	Crude protein
	(d)	(WSC, % DM)	(CP, % DM)
ME	0	9.53±0.20Aa	10.75±0.26Aa
	30	1.94±0.05Bc	0.58±0.05Ba
	60	2.12±0.05Bb	0.41±0.05Bb
CA	0	9.53±0.20Aa	10.75±0.26Aa
	30	2.65±0.28Bb	0.64±0.13Ba
	60	4.39±1.55Ba	0.82±0.13Ba
CB	0	9.53±0.20Aa	10.75±0.26Aa
	30	3.80±0.14Ba	0.73±0.13Ba
	60	2.99±0.19Cab	0.76±0.05Ba

注:同列不同小写字母表示相同处理时间不同处理组差异显著 ($P<0.05$),同列不同大写字母表示相同处理组不同处理时间差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: The same column with different lowercase indicate significant difference at $P<0.05$ among different groups at the same treatment time, the same column with different capital letters indicate significant difference at $P<0.05$ for the same groups within different treatment time. The same below.

表 4 混贮过程中有机酸的变化

Table 4 Changes of organic acids during silage

处理组	时间	pH	乙醇	乳酸	乙酸	丙酸	丁酸	乳乙比	乳酸/	氮氮/总氮
Treatment	Time		Ethanol	Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyrate	LA/AA	总有机酸	AN/TN
	(d)		(EA, % DM)	(LA, % DM)	(AA, % DM)	(PPA, % DM)	(BA, % DM)	LA/AA	LA/TOA	
ME	30	4.15±0.00Ba	0.71±0.04Aa	3.78±0.04Bb	0.77±0.02Bb	0.09±0.01Ab	0.25±0.03Ab	4.91	0.77	2.10±0.19Aa
	60	4.36±0.01Aa	0.67±0.05Aa	5.07±0.03Ac	1.27±0.05Aa	0.08±0.01Aa	0.21±0.01Bb	3.99	0.77	1.83±0.25Aa
CA	30	4.08±0.01Ab	0.33±0.01Bc	3.53±0.07Bc	0.87±0.02Ba	0.09±0.01Ab	0.23±0.03Bb	4.06	0.75	1.20±0.22Ab
	60	3.93±0.00Bb	0.73±0.06Aa	5.76±0.01Ab	1.36±0.10Aa	0.10±0.01Aa	0.43±0.11Aa	4.24	0.75	1.25±0.19Ab
CB	30	3.91±0.00Bc	0.63±0.03Ab	6.25±0.02Ba	0.84±0.03Ba	0.17±0.02Aa	0.37±0.06Aa	7.44	0.82	1.49±0.27Ab
	60	3.93±0.01Ab	0.66±0.13Aa	7.13±0.07Aa	1.06±0.02Ab	0.11±0.02Ba	0.40±0.05Aa	6.73	0.82	1.23±0.08Ab

2.3 纤维素酶对贮存过程中微生物菌群的动态影响

2.3.1 门分类水平细菌群落组成 如图 1 所示,原料 DCS 中主要包括厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria),相对丰度分别为 33.78%和 65.26%;少量的放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度均低于 1.00%。原料 CW 中 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 是主要类群,相对丰度分别为 80.23%和 18.57%;Firmicutes 和 Proteobacteria 丰度都低于 1.00%。DCS 和 CW 混贮 30 和 60 d 时,ME 组主要包括 Firmicutes 和 Proteobacteria,且 Firmicutes 丰度逐渐提高,Proteobacteria 丰度逐渐下降;30 d 时相对丰度分别为 51.10%和 48.30%,60 d 时分别为 56.60%和 40.40%;此外还含有少量 Actinobacteria 和 Bacteroidetes,但

二者丰度之和仍低于 1.00%。添加纤维素酶混贮后,CA 和 CB 组也主要包含 Firmicutes 和 Proteobacteria,且变化趋势与 ME 组相同,前者丰度逐渐增加,后者丰度则逐渐下降。除此之外,CA 和 CB 组中的 Actinobacteria 和 Bacteroidetes 丰度也有所增加,但贮存过程中二者丰度之和仍低于 5.00%。

2.3.2 属分类水平细菌群落组成 由图 2 可知,原料 DCS 中含有肉食杆菌属(*Carnobacterium*)和肠球菌属(*Enterococcus*)等乳酸菌,相对丰度分别为 27.71%和 0.94%,同时附着有大量鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛生菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)等非乳酸细菌,其中 *Enterobacter* 和 *Pantoea* 丰度较高,分别为 47.11%和 10.14%;原料 CW 附着的乳酸细菌含量极低,相对丰度仅为 0.90%,但存在大量腐败细菌,尤其 *Pantoea*、*Pseudomonas* 和 *Chryseobacterium* 等丰度较高,分别为 17.10%、48.40%和 16.26%,此外也有少量 *Enterobacter* 等,可见 CW 若不及时处理极易腐败变质。

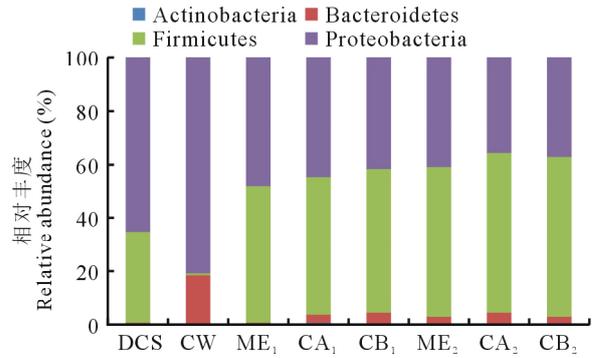


图 1 贮存过程中门水平细菌群落组成

Fig. 1 The composition of bacterial community at the phylum level during storage

Actinobacteria: 放线菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Firmicutes: 厚壁菌门; Proteobacteria: 变形菌门。DCS: 干玉米秸秆; CW: 废弃白菜; ME₁: 30 d 的无酶添加对照组; CA₁: 30 d 的低剂量组; CB₁: 30 d 的高剂量组; ME₂: 60 d 的无酶添加对照组; CA₂: 60 d 的低剂量组; CB₂: 60 d 的高剂量组。下同。DCS: Dry corn straw; CW: Cabbage waste; ME₁: Non-additive at 30 d; CA₁: Group CA (dose of 0.1%) at 30 d; CB₁: Group CB (dose of 0.3%) at 30 d; ME₂: Non-additive at 60 d; CA₂: Group CA (dose of 0.1%) at 60 d; CB₂: Group CB (dose of 0.3%) at 60 d; The same below.

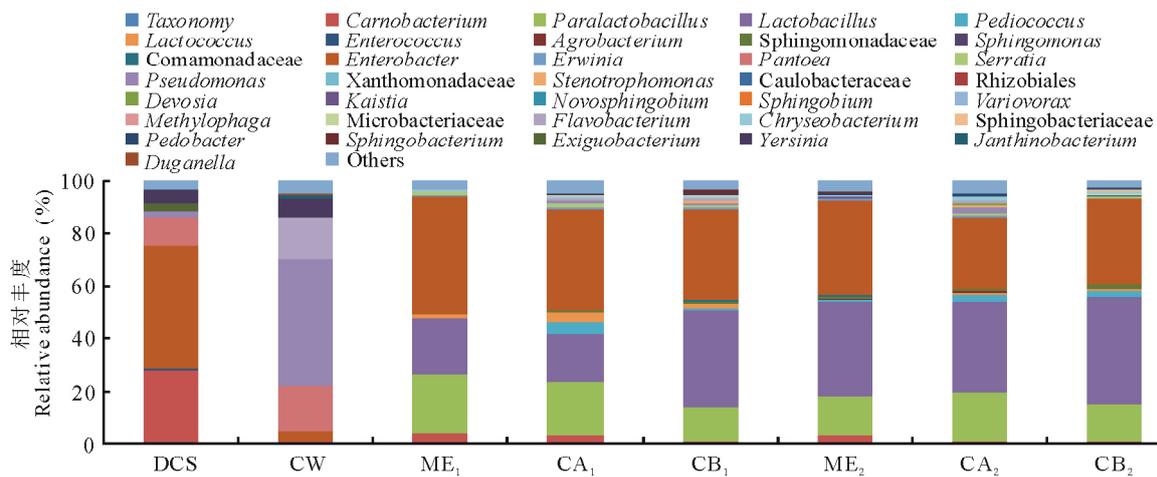


图 2 贮存过程中属水平细菌群落组成

Fig. 2 The composition of bacterial community at the genus level during storage

Carnobacterium: 肉食杆菌属; *Paralactobacillus*: 类乳杆菌属; *Lactobacillus*: 乳杆菌属; *Pediococcus*: 片球菌属; *Lactococcus*: 乳球菌属; *Enterococcus*: 肠球菌属; *Agrobacterium*: 农杆菌属; *Sphingomonadaceae*: 鞘脂单胞菌科; *Sphingomonas*: 鞘氨醇单胞菌属; *Comamonadaceae*: 丛毛单胞菌科; *Enterobacter*: 肠杆菌属; *Erwinia*: 欧文氏菌属; *Pantoea*: 泛生菌属; *Serratia*: 沙雷士菌属; *Pseudomonas*: 假单胞菌属; *Xanthomonadaceae*: 黄单胞菌科; *Stenotrophomonas*: 寡养食单胞菌; *Caulobacteraceae*: 柄杆菌科; *Rhizobiales*: 根瘤菌目; *Devosia*: 德沃斯氏菌属; *Novosphingobium*: 新鞘脂菌属; *Sphingobium*: 鞘脂菌属; *Variovorax*: 贪噬菌属; *Methylophaga*: 噬甲基菌属; *Microbacteriaceae*: 微杆菌科; *Flavobacterium*: 黄杆菌属; *Chryseobacterium*: 金黄杆菌属; *Sphingobacteriaceae*: 鞘脂杆菌科; *Pedobacter*: 地杆菌属; *Sphingobacterium*: 鞘氨醇杆菌属; *Exiguobacterium*: 微小杆菌; *Yersinia*: 耶尔森氏菌属; *Janthinobacterium*: 詹森菌属; *Duganella*: 杜榭氏菌属; others: 其他。

DCS 与 CW 混贮后,ME 组中乳酸细菌主要包括肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、类乳杆菌属(*Paralactobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)和乳球菌属(*Lactococcus*),其中 *Paralactobacillus* 和

Lactobacillus 相对丰度较高,30 d 分别为 22.90%和 20.70%,60 d 时为 15.40%和 35.40%,前者随时间延长丰度下降,后者则升高。ME 组中非乳酸细菌主要为 *Enterobacter*,且丰度从 30 d 时的 44.90%下降为 60 d 时的 36.00%,除沙雷士菌属(*Serratia*)相对丰度为 1.40%外,其余 *Sphingomonas*、*Pseudomonas* 及 *Chryseobacterium* 等非乳酸细菌属的丰度均在 1.00%以下。

加入纤维素酶混贮后,CA、CB 组中肠杆菌属(*Enterobacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和类乳杆菌属(*Paralactobacillus*)等细菌的相对丰度较高,30 d 时这 3 类细菌在 CA 组中的丰度依次为 38.80%、18.10%和 20.90%,60 d 时依次为 27.40%、33.70%和 18.70%;CB 组 30 d 时丰度依次为 35.80%、37.10%和 13.20%,60 d 时依次为 32.20%、40.80%和 13.80%。另一方面,30 d 时 ME、CA 和 CB 组总乳酸细菌丰度分别为 49.00%、44.40%和 52.80%,与 ME 组相比,CB 组的总乳酸细菌丰度提高,但 CA 组下降;CA 和 CB 组还新增了片球菌属(*Pediococcus*)、寡养食单胞菌(*Stenotrophomonas*)、鞘脂杆菌科(*Sphingobacteriaceae*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和农杆菌属(*Agrobacterium*),但其相对丰度均低于 5.00%。60 d 时,CA 和 CB 组总乳酸细菌丰度均高于 ME 组,且 CB 组丰度最高,达 58.90%;*Enterobacter* 相对丰度明显下降,且 CA 组由 30 d 的 38.80%降至 60 d 的 27.40%,下降较快;CB 组由 30 d 时的 35.10%降至 60 d 时的 32.20%,均低于 ME 组腐败菌的相对丰度(30 d 时的 44.90%和 60 d 时的 36.00%)。总之,添加纤维素酶明显降低了 *Enterobacter* 的相对丰度,提高了乳酸细菌相对丰度,且 CB 组始终高于 CA 组,说明高剂量纤维素酶更有利于提升乳酸菌相对丰度。

2.3.3 乳酸细菌的多样性分析 乳酸细菌是青贮发酵过程中的优势菌,对贮存品质优劣起重要作用,因此有必要了解乳酸菌属的多样性。由图 3 可知,DCS 和 CW 中乳酸菌主要为肉食杆菌属(*Carnobacterium*),所占比例分别为 96.50%和 95.56%,还含有少量肠球菌属(*Enterococcus*)和乳球菌属(*Lactococcus*),但由于 CW 自身附着的乳酸细菌丰度不足 1.00%,故混贮原料附着的乳酸菌主要来自 DCS。3 个处理组在 30 和 60 d 时主要包含 *Carnobacterium*、*Enterococcus*、类乳杆菌属(*Paralactobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和 *Lactococcus* 等乳酸菌。其中,*Paralactobacillus* 和 *Lactobacillus* 在乳酸细菌中所占比重较高,30 d 时二者在 CA 组中占乳酸细菌的比重分别为 40.66%和 35.21%,CB 组中所占比重分别为 24.44%和 70.30%;60 d 时二者在 CA 组中占乳酸细菌的比重分别为 31.64%和 57.02%,CB 组中所占比重分别为 23.27%和 68.80%。另一方面,随着时间的延长,CA 组中 *Lactobacillus* 比重逐渐提高,*Paralactobacillus* 比重逐渐下降,而 CB 组中 *Lactobacillus* 和 *Paralactobacillus* 略有降低,但其 *Lactobacillus* 的比重仍高于 ME 和 CA 组。

3 讨论

3.1 纤维素酶对混贮化学组分的影响

原料 DCS 与 CW 混合后的水分和 WSC 含量能达到青贮要求,二者混贮有利于乳酸发酵和 pH 的快速下降,从而减少原料中的养分损失。加入纤维素酶的 CA 和 CB 组中 WSC 含量损失更少,原因是纤维素酶能分解原料中 NDF 和 ADF 等纤维组分为乳酸菌可利用的单糖,降低原料中 CL 含量的同时增加发酵底物量,促进乳酸菌等有益菌发酵繁殖。表 2 中 NDF 和 ADF 含量的变化也说明了这一点。庄苏等^[14]认为纤维素酶处理显著降低了

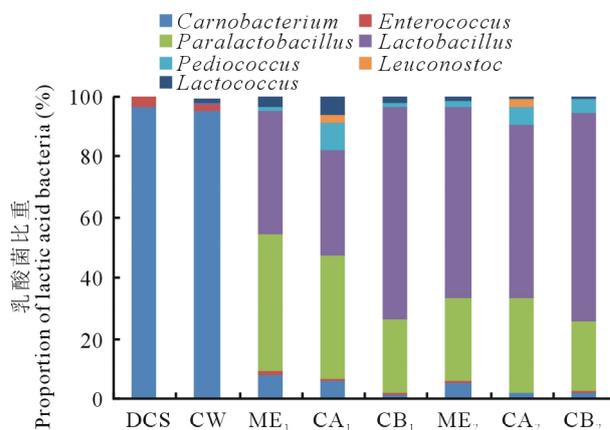


图 3 贮存过程中乳酸细菌群落组成

Fig. 3 Lactic acid bacteria community composition during storage

Carnobacterium: 肉食杆菌属; *Enterococcus*: 肠球菌属; *Paralactobacillus*: 类乳杆菌属; *Lactobacillus*: 乳杆菌属; *Pediococcus*: 片球菌属; *Leuconostoc*: 明串珠菌属; *Lactococcus*: 乳球菌属。

青贮料中 NDF 和 ADF 含量,并显著增加 WSC 含量。薛艳林^[15]认为青贮发酵过程中的微生物和酶类物质能降解半纤维素为微生物可直接利用的 WSC,经青贮发酵后的 NDF 含量显著降低。倪奎奎等^[16]认为纤维素酶的添加显著降低了麦秸青贮料的 NDF 和 ADF 含量。Amvan 等^[17]也认为添加纤维素酶能使青贮牧草的 NDF 和 ADF 含量显著降低。另一方面,纤维素酶的加入促进了 ADL 的分解,弱化了其对纤维素等结构性碳水化合物的束缚,有利于提高混贮料在动物瘤胃中的生物降解效率或能源转化效率。王晓娟等^[18]认为 ADL 对 CL 和 HC 等碳水化合物既有物理性阻碍,又有牢固共价键束缚,使其对酶或微生物作用有屏障保护。总之,加入纤维素酶有利于保存 WSC、HC 和 HoC 等组分,显著降低 NDF、ADF 等组分含量,这与 Sun 等^[19]研究结果一致。

3.2 纤维素酶对混贮发酵品质的影响

混贮过程中快速生成乳酸和 pH 迅速下降是青贮成功并获得高品质青贮料的关键因素。青贮发酵过程中除生成较高含量的乳酸外,还会生成乙酸、丙酸和丁酸等小分子有机酸,但 pH 下降主要缘于乳酸的累积。一般认为,发酵良好的青贮料中,乳酸含量应占到总有机酸的 60% 以上,乙酸含量占 1%~4%,丙酸含量占 1.5% 左右,丁酸含量则接近于 0,乳酸/乙酸(LA/AA)值应高于 2:1^[20]。试验中,3 个处理组均符合上述良好青贮条件,但与无添加剂 ME 组相比,CA 和 CB 组 pH 值下降速度明显加快,且高剂量 CB 组 LA/AA 和乳酸占总有机酸比例(LA/TOA)均明显高于 CA 和 ME 组,说明高剂量纤维素酶的添加有利于强化乳酸发酵,提高乳酸生成比重,这与高剂量纤维素酶能有效提升乳酸菌相对丰度结果一致。Selmer-olsen^[9]认为用纤维素酶处理的梯牧草、牛毛草和红三叶草混合青贮,显著降低了青贮 pH,增加了乳酸含量。Tengerdy 等^[22]研究也发现纤维素酶的添加能显著降低青贮料的 pH 值,增加乳酸和 WSC 含量,本研究结论与其一致。另有报道认为,当青贮料中乳酸/乙酸高于 3 时,一般是同型发酵乳酸菌占主导地位^[23]。推测试验中 3 个处理组可能均为同型乳酸发酵。

氨态氮主要是微生物或酶分解蛋白质、氨基酸和含氮物质所生成,AN/TN 值越大,说明蛋白质分解程度越高,青贮质量越差。试验中加入纤维素酶后,CA 和 CB 组均使 AN/TN 值显著降低($P < 0.05$),且远低于优质青贮料的推荐值 10%,说明纤维素酶的添加有助于减少蛋白质损失。Dean 等^[24]也认为青贮料中添加纤维素酶能够获得较低的 pH 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量,从而提高青贮品质。但从粗蛋白角度分析,贮存 30 d 时 3 个处理组中粗蛋白含量均显著下降,且含量不足 1%,原因可能是因为原料中粗蛋白在植物蛋白酶与微生物的共同作用下先分解为肽氮和游离氨基酸氮,其中一小部分氨基酸进一步被降解成氨、有机酸及生物胺等产物。尤其贮存体系 pH 值低于 4.2 时蛋白质一般分解为较稳定的氨基酸^[25],并不会继续降解为氨等产物,所以出现了 CP 含量很少而 AN/TN 值不高的状态,推测试验中蛋白质主要分解为肽或者氨基酸产物。

另外,贮存 60 d 期间 3 个处理组的感官品质均为优等,但 V-score 评分结果却为尚可。出现这种差异的原因可能是感官评定存在一定的主观性,个人评价之间存在差异,而 V-score 评分则根据氨态氮含量以及乙酸、丙酸、丁酸等挥发酸含量来确定发酵品质,较为客观。Filya^[26]认为优质青贮料应具有较高含量的乳酸和较低的丁酸、氨态氮含量及 pH 值,试验中 3 个处理组均符合优质青贮标准,且 CA 和 CB 组品质更好。总之,纤维素酶的加入改善了秸秆与白菜的混贮发酵品质,有利于乳酸生成,降低 pH 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量,高剂量纤维素酶(0.3%)对混贮发酵品质的促进效果更明显。

3.3 纤维素酶对微生物菌群的影响

贮存过程中感官品质、化学组分及发酵品质的变化本质上是微生物菌群共同作用的结果。从门水平细菌群落分析,原料 DCS 主要包含 Proteobacteria 和 Firmicutes,CW 主要包含 Proteobacteria 和 Bacteroidetes,混合贮存 60 d 期间始终以 Proteobacteria 和 Firmicutes 为主。加入纤维素酶后,无论剂量高低,仍以 Proteobacteria 和 Firmicutes 为主,但高剂量纤维素酶 CB 组的 Firmicutes 丰度明显提高,而 Proteobacteria 丰度在 CA 和 CB 组则明显下降。据报道,芽孢杆菌能降解大分子化合物,如纤维素、淀粉、蛋白质等有机组分^[12],而 Firmicutes 细菌可产芽孢,所以推测加入纤维素酶的 CA 和 CB 组 ADF、NDF 及 CP 含量的显著降低也可能是由 Firmicutes 引起的。

从属水平细菌群落可知,CW 中乳酸细菌含量不足 1%,DCS 中有约 28% 左右的乳酸细菌,二者混贮具有乳酸细菌互补性,能使混贮发酵过程快速启动,并抑制腐败菌生长。试验中 ME 组包括 *Enterobacter*、*Lactobacil-*

lus、*Paralactobacillus*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Carnobacterium* 和 *Serratia* 等近 30 个属,细菌丰富程度较高,与其他学者报道结果有一致也有差异。Dunière 等^[27]发现玉米青贮中主要细菌包括 *Paenibacillus*、*Flavobacteriaceae*、*Sphingomonas*、*Exiguobacterium*、root nodule bacteria、*Acinetobacter* 和 *Buchnera* 等。刘晶晶等^[28]发现青贮柳枝稷中主要包括 *Lactobacillus*、*Enterobacter*、*Enterococcus*、*Clostridium*、*Aerococcus*、*Sporolactobacillus*、*Lachnospira*、*Ruminococcaceae*、*Weissella*、*Pantoea* 和 *Serratia* 等。加入纤维素酶后,CA 和 CB 组主要的属水平细菌与 ME 组基本一致,但加入纤维素酶后乳酸菌属的相对丰度大大提高,并使有害菌 *Enterobacter* 丰度明显降低,尤其高剂量纤维素酶使 CB 组乳酸细菌丰度高达 55.70%。正是这些乳酸细菌的快速繁殖和主要代谢物乳酸的积累使贮存过程 pH 快速下降,从而抑制腐败细菌,促进了有机组分的保存,这与发酵品质、化学组分变化结果一致。

乳酸菌是影响青贮品质好坏的主要有益微生物。Cai 等^[21]发现从青贮水稻中分离得到 161 株乳酸菌包含 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Enterococcus* 和 *Pediococcus*,这些菌株主要为同型发酵乳酸菌,占总数的 66.00%。乳酸菌多样性结果显示,原料中乳酸菌主要为 *Carnobacterium*,但 DCS 和 CW 混贮后的 *Carnobacterium* 所占的比例不足 10%,逐渐演变成 *Paralactobacillus* 和 *Lactobacillus* 为主要乳酸细菌。加入纤维素酶后,CA 和 CB 组中仍以 *Paralactobacillus* 和 *Lactobacillus* 为主,且 CA 组的 *Paralactobacillus* 始终高于 CB 组,而 CB 组 *Lactobacillus* 始终高于 CA 组,这可能是纤维素酶添加剂量高低所致,但总体上贮存期间均以耐酸性能较好的杆菌为主。

4 结论

加入纤维素酶有效促进了干玉米秸秆与白菜废弃物的混贮发酵和乳酸生成,使 pH 值快速下降,从而抑制有害菌生长。低剂量纤维素酶有利于 ADL 组分的降解以及 WSC、HC 和 HoC 等组分的保存,高剂量纤维素酶有助于改善发酵品质,但综合考虑有机组分保存和酶制剂成本等因素,建议选择低剂量纤维素酶(0.1%)。

参考文献 References:

- [1] Yang D L, Wang J X, Feng W H, *et al.* Effects of broccoli stems and leaves and maize straw mix-ensiling on silage quality. *Pratacultural Science*, 2014, 31(3): 551–557.
杨道兰, 汪建旭, 冯炜弘, 等. 花椰菜茎叶与玉米秸秆的混贮品质. *草业科学*, 2014, 31(3): 551–557.
- [2] Wang D, Li F D, Zhang Y D, *et al.* Mixed silage of potato pulp and corn straw affects rumen environment and serum biochemical parameters of beef cattle. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(7): 1361–1367.
王典, 李发弟, 张养东, 等. 马铃薯淀粉渣和玉米秸秆混合青贮料对肉牛瘤胃内环境及血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2012, 24(7): 1361–1367.
- [3] Li X X, Zhang Y G, Zhang W W, *et al.* Effects of mixing corn steep liquor with dry rice straw in different proportions on fermentation quality and nutrient composition of yellow rice straw silage feed. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(11): 2682–2688.
李欣新, 张永根, 张微微, 等. 玉米浆与干稻秸以不同比例混合对黄贮饲料发酵品质和营养成分的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(11): 2682–2688.
- [4] Ren H W, Zhao T, Li J P, *et al.* Quality and lactic acid bacteria of mixed corn stalk and cabbage waste silage. *Acta Pratacultural Sinica*, 2016, 25(1): 197–206.
任海伟, 赵拓, 李金平, 等. 玉米秸秆与废弃白菜的混贮品质及乳酸菌多样性研究. *草业学报*, 2016, 25(1): 197–206.
- [5] Ren H W, Dou J W, Zhao T, *et al.* Effect of additives on mixed silage quality of corn stover and asparagus lettuce leaves. *Acta Pratacultural Sinica*, 2016, 25(10): 142–152.
任海伟, 窦俊伟, 赵拓, 等. 添加剂对玉米秸秆和莴笋叶混贮品质的影响. *草业学报*, 2016, 25(10): 142–152.
- [6] Tao L, Yu Z. The dynamic of *Ceratoides arborescens* fermentation quality in the process of ensiling. *Acta pratacultural Sinica*, 2009, 18(6): 122–127.
陶莲, 玉柱. 华北驼绒藜青贮贮藏过程中发酵品质的动态变化. *草业学报*, 2009, 18(6): 122–127.
- [7] Chen X Z, Zhang W C, Zhang J G, *et al.* Effect of cellulase on quality of napier grass and corn straw mixed silage. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2011, 32(6): 46–50.
陈鑫珠, 张文昌, 张建国, 等. 纤维素酶对象草玉米秸秆混合青贮品质的影响. *家畜生态学报*, 2011, 32(6): 46–50.

- [8] Zhao Z, Chen X W, Zhu M F, *et al.* Effects of lactobacillus and cellulase on the quality of corn stover silage. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009, 40(7): 919–922.
赵政, 陈学文, 朱梅芳, 等. 添加乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆青贮饲料品质的影响. *广西农业科学*, 2009, 40(7): 919–922.
- [9] Selmer-Olsen I. Enzymes as silage additives for grass-clover mixtures. *Grass & Forage Science*, 2010, 49(3): 305–315.
- [10] Xu Y, Sun Y M, Zheng T, *et al.* Screening strains of desulfurization bacteria by high-throughput sequencing. *Ciesc Journal*, 2014, 65(5): 1808–1814.
徐瑛, 孙永明, 郑涛, 等. 高通量测序技术辅助筛选脱硫菌. *化工学报*, 2014, 65(5): 1808–1814.
- [11] Li L H, Sun Y M, Yuan Z H, *et al.* Effect of microalgae supplementation on the silage quality and anaerobic digestion performance of manyflower silvergrass. *Bioresource Technology*, 2015, 189(10): 334–340.
- [12] Tao L, Diao Q Y. Effects of ensiling on fermentation quality and bacteria composition of corn stalk. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(1): 198–207.
陶莲, 刁其玉. 青贮发酵对玉米秸秆品质及菌群构成的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(1): 198–207.
- [13] Feng X C, Zeng J, Li W J, *et al.* Study on the grading system of natural grassland forage silage. *Grassland and Prataculture*, 2016, 28(1): 48–52.
冯晓骋, 曾洁, 李伟军, 等. 天然草原牧草青贮饲料评级体系进展研究. *草原与草业*, 2016, 28(1): 48–52.
- [14] Zhuang S, Yan R, Ding L R, *et al.* Effects of cellulase and xylanase on the fermentation quality of elephant grass (*Pennisetum purpureum* schumach) silages during ensiling. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2009, 32(4): 148–153.
庄苏, 颜瑞, 丁立人, 等. 纤维素酶与木聚糖酶对象草青贮发酵品质的影响. *南京农业大学学报*, 2009, 32(4): 148–153.
- [15] Xue Y L. Silage characteristics of main plants and communities in typical grassland. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
薛艳林. 典型草原主要植物及群落青贮特性. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [16] Ni K K, Huo Y P, Nishino Naoki, *et al.* Research on the bacterial community and fermentation quality of whole crop rice silage. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016.
倪奎奎, 霍裕平, 西野直树, 等. 全株水稻青贮饲料中微生物菌群以及发酵品质分析. 郑州: 郑州大学. 2016.
- [17] Amvan V, Bergsma K, Frolkramer F, *et al.* Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage. *Grass & Forage Science*, 1989, 44(2): 223–230.
- [18] Wang X J, Yang Y, Zhang X Q, *et al.* To make biofuel: cutting the lignin or loosening lignin's grip. *Chinese Agricultural Science*, 2015, 48(2): 229–240.
王晓娟, 杨阳, 张晓强, 等. 木质素与生物燃料生产: 降低含量或解除束缚. *中国农业科学*, 2015, 48(2): 229–240.
- [19] Sun Z H, Liu S M, Tayo G O, *et al.* Effects of cellulase or lactic acid bacteria on silage fermentation and invitro gas production of several morphological fractions of maize stover. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 152(3): 219–231.
- [20] Meng Q X, Yang J X. Production and quality evaluation of whole plant corn silage. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2016.
孟庆翔, 杨军香. 全株玉米青贮制作与质量评价. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2016.
- [21] Cai Y, Suyanandana P, Saman P, *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal of General & Applied Microbiology*, 1999, 45(4): 177–184.
- [22] Tengerdy R P, Weinberg Z G, Szakacs G, *et al.* Ensilage alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991, 55: 215–228.
- [23] Kung L Jr, Ranjit N K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(5): 1149–1155.
- [24] Dean D B, Adesogan A T, Krueger N, *et al.* Effect of fibrolytic cellulase on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(3): 994–1003.
- [25] Jia J X, Liang B Z, Wang Y H, *et al.* Effect of steam explosion pretreatment on ensiling performance of dry corn stover. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(20): 192–198.
贾晶晶, 梁宝忠, 王艳红, 等. 不同汽爆预处理对干玉米秸秆青贮效果的影响. *农业工程学报*, 2013, 29(20): 192–198.
- [26] Filya I. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, and *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(11): 3575–3581.
- [27] Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, *et al.* Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science & Technology*, 2013, 182(1/4): 1–15.
- [28] Liu J J, Gao L J, Shi J F, *et al.* Lactic acid bacteria community and *Lactobacillus plantarum* improving silaging effect of switchgrass. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2015, 31(9): 295–302.
刘晶晶, 高丽娟, 师建芳, 等. 乳酸菌复合系和植物乳杆菌提高柳枝稷青贮效果. *农业工程学报*, 2015, 31(9): 295–302.