

饲草青贮微生物多样性研究进展及对策

刘悦¹ 字学娟^{1*} 陈婷¹ 李茂²

(1.海南大学林学院, 儋州 571737; 2.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 儋州 571737)

摘要: 饲草表面的微生物群落结构以及微生物群落演替特征是影响饲草青贮发酵特性的关键因素之一。来自于不同地区以及不同种类的饲草表面微生物种类差异较大, 从而使发酵特性多样化。青贮饲料的发酵品质由微生物的群落结构及其演替过程所主导, 而这二者不仅受牧草表面附着的微生物的影响, 且外源青贮添加剂的作用也不可忽视。本文总结了不同区域、不同种类饲草青贮的微生物群落结构和演替规律以及青贮添加剂对微生物群落的影响。总的看来, 不同区域环境、不同饲草种类以及不同青贮添加剂类型都影响了饲草青贮微生物多样性, 并造成了青贮发酵品质的差异。为了获得优质青贮饲料必须综合考虑环境因素、饲草特性以及添加剂类型, 建议对不同的饲草进行差异化的青贮调制。

关键词: 青贮; 微生物多样性; 环境因素; 青贮添加剂; 饲草

中图分类号: S816.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)11-6084-09

青贮是一种利用乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)进行发酵, 长期保存新鲜青绿饲料作物、牧草等饲草的存贮方式^[1]。青贮技术已有 3 000 多年的历史^[2], 随着保存技术的不断改进、管理技术的发展以及对发酵过程中微生物种类和作用认识的增强, 目前已成为最常用的饲草保存技术。优质青贮饲料具备适口性好、养分含量高、消化率较高等优点, 在粗饲料供应不足的冬春季是反刍动物优质饲料的重要来源^[3], 是动物维持生产性能的重要保障。

青贮饲料发酵过程由微生物参与, 原料表面的微生物区系主要由醋酸菌属(*Acetobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、腐败菌、霉菌、酵母菌和 LAB 等构成。LAB 起主导作用, 主要通过以下 2 个途径实现: 一是利用可溶性碳水化合物产生乳酸来降低 pH; 二是 LAB 与不良微生物竞争营养物质, 还可以产生细菌素等具有抑菌活性的代谢产物, 来抑制其生长^[4]。据报道, 每克青贮原料中 LAB 数

量必须在 10^5 个以上才能保证青贮质量, 然而自然条件下, 青贮原料表面附着的好氧细菌数量要远远高于 LAB 数量^[5], 因此青贮调制时需通过使用添加剂来直接或间接增加 LAB 数量, 从而保证青贮发酵品质。

从本质上来讲, 饲草表面微生物区系影响青贮细菌群落的演替, 进而影响了发酵产物。而由于饲草表面微生物特性存在差异, 从而使发酵过程多样化。例如由于地理和气候因素, 不同地区的饲草微生物多样性存在明显差异; 由于植物对外界环境差异的适应性, 当植物种类不同或是植物种类相同地区不同时, 其表面附着的微生物群落都大不相同。因此, 对饲草表面微生物和青贮发酵过程中微生物多样性的变化进行研究, 从青贮微生态系统的角度调控青贮发酵品质具有重要的研究和实践价值。近年来, 国内外研究人员将青贮微生物群落作为关注的重点, 开展了大量研究。本文试图就饲草青贮微生物多样性研究进行

收稿日期: 2021-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860680); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(1630032021003, 1630032017033); 农业农村部项目(16200159); 滇桂黔石漠化地区特色作物产业发展关键技术集成示范项目

作者简介: 刘悦(1998—), 女, 黑龙江绥化人, 硕士研究生, 从事热带牧草青贮微生物研究。E-mail: ly943959080@163.com

* 通信作者: 字学娟, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zixuejuan@163.com

阶段总结,以期为基于青贮微生物群落的青贮发酵品质调控提供科学依据。

1 青贮过程中微生物的演替

许多细菌在饲草表面可以存活,但在选择性培养基上不能培养,因此对其认知可能存在偏差。随着高通量测序技术的发展和运用,使我们得以认识发酵过程中微生物群的组成和动态^[6]。在起始阶段,大肠杆菌(*Escherichia coli*)大量繁殖,好氧细菌在前几小时活跃,直到氧气被消耗殆尽,

LAB 逐渐代替大肠杆菌,接着乳球菌属(*Lactococcus*)开始大量繁殖,发酵体系 pH 随之下降,从而抑制了酵母菌、霉菌及好氧细菌繁殖,随着发酵进行,发酵体系 pH 进一步降低,更耐酸的乳杆菌属(*Lactobacillus*)大量繁殖并主导发酵过程^[7-8]。最后是有氧腐败阶段(二次发酵),由于空气的进入,使得青贮饲料的 pH、温度升高,促使霉菌、梭菌及其他好氧菌生长繁殖,从而影响青贮品质。青贮发酵过程中常见的微生物见表 1。通常为了加快发酵进程、促进乳酸发酵,青贮添加剂被广泛使用^[3]。

表 1 青贮发酵过程中常见的微生物
Table 1 Normally micro-organisms in silage fermentation process^[9]

微生物 Micro-organisms	好氧阶段 Aerobic phase	发酵阶段 Fermentation phase	稳定阶段 Stable phase	饲喂阶段 Feed-out phase
乳酸菌 Lactic acid bacteria	种群数量较少	种群数量增加	种群存在	种群数量减少
肠杆菌 Enterobacter	种群存在	种群数量减少	种群不存在	种群不存在
酵母菌 Yeast	种群存在	种群数量较少	种群数量较少	种群数量增加
霉菌 Mould	种群存在	种群数量减少并以孢子的形式存在	种群数量减少并以孢子的形式存在	种群数量增加
梭菌属 Clostridium	种群存在	种群以孢子的形式存在	种群以孢子的形式存在	种群开始发展厌氧微生物生态位
李斯特菌属及醋酸菌属 Listeria and Acetobacter	种群存在	种群数量减少	种群不存在	种群数量增加

2 饲草青贮微生物多样性

2.1 不同区域饲草青贮微生物多样性差异

由于地理、气候条件的差异,使得饲草本身附着微生物群落结构有着极大的不同。因此青贮发酵体系中微生物群落的动态变化也各不相同。

青藏高原极端而独特的生态环境及其在局部地区的变化可能导致牧草附生微生物适应性进化并产生多样性,低海拔地区青贮中 LAB 包括戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和棒状乳酸菌(*Lactobacillus coryniformis*),而高海拔地区 LAB 则包括肠系膜乳杆菌(*Lactobacillus mesenteroides*)和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)^[10]。在青藏高原优势物种垂穗披碱草(*Elymus nutans*)青贮饲料中的 LAB 主要包括 6 个属,分别为肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属、片球菌属(*Pediococcus*)、明串珠属(*Leuconostoc*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和乳球菌属^[11];而热带气候条件下的青贮饲料乙酸发

酵能力较强,主要微生物可能由乳杆菌属和肠杆菌属(*Enterobacter*)组成,而研究人员已证实这 2 种微生物是热带青贮饲料中最可能的优势菌属^[12-13]。

在我国的其他地区也有相关研究报道,且乳杆菌属在大多数情况下为优势菌群。如在北方地区采集的 47 个玉米(*Zea mays* L.)青贮样品中择优选择 33 个样品,丰富度在属水平排序依次为乳杆菌属和醋酸菌属^[14]。在内蒙古自治区,卢强等^[15]发现,苜蓿青贮不含添加剂的时候,除乳杆菌属外,肠球菌属、乳球菌属也起主要作用。且随着青贮发酵的发展,不同时期 LAB 的种类和丰度不同^[15]。任海伟等^[16]研究表明,甘肃白酒糟或菊芋渣混合发酵时优势菌也为乳杆菌属。刘蓓一等^[17]在江苏的相关研究表明,乳杆菌属是大麦(*Hordeum vulgare* L.)青贮的优势菌属,有氧暴露增加了有害菌不动杆菌属(*Acinetobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)的相对丰度。梁辛等^[18]在广西南宁的研究发现,在甘蔗梢自然青贮初期以乳杆菌属、葡

萄球菌属 (*Staphylococcus*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*) 为主, 发酵后期乳杆菌属占据绝对优势。但乳杆菌属并非在所有饲草中都占据优势地位, Li 等^[19]发现热带牧草柱花草青贮中优势菌群为魏斯氏菌属、肠杆菌属和泛菌属 (*Pantoea*)。另外, 有报道三江源试验区燕麦及其组合饲草的叶部优势菌群也以肠杆菌属、泛菌属、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 及欧文氏菌属 (*Erwinia*) 为主, 筛选得到的优良菌株为肠杆菌属的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)^[20]。

2.2 不同青贮原料青贮微生物多样性差异

通常情况下, 植物表面主要附着的细菌是好氧细菌, 真菌是酵母菌和霉菌, 对青贮发酵有利的 LAB 数量较少^[21]。植物表面微环境如湿度、太阳辐射强度、植物表面结构以及营养元素分布等会影响附着微生物的构成。

2.2.1 不同牧草

一般来说, 牧草表面附着的酵母菌数量为 $1 \sim 7 \lg(\text{CFU/g FM})$, LAB 数量为 $1 \sim 7 \lg(\text{CFU/g FM})$, 霉菌数量为 $1 \sim 6 \lg(\text{CFU/g FM})$, 有很大的变化范围^[22-26]。因种类、生长环境和生育期的不同而异。禾本科牧草上不仅附着 LAB 数量少, 且不良微生物数量较多。例如青贮前藜草 (*Phalaris arundinacea* L.) 上附着的 LAB 数量较少 [$1.4 \sim 1.8 \lg(\text{CFU/g FM})$], 有大量的不良微生物, 包括需氧细菌 [$4.6 \sim 5.9 \lg(\text{CFU/g FM})$]、酵母菌 [$5.2 \sim 5.7 \lg(\text{CFU/g FM})$] 和霉菌 [$3.8 \sim 4.8 \lg(\text{CFU/g FM})$]^[24]; 而在典型的木本饲草辣木 (*Moringa oleifera*) 和团花树 (*Neolamarckia cadamba*) 之中, 研究人员发现青贮前蓝细菌 (*Cyanobacterium*) 占优势^[24]。

2.2.2 同种牧草不同环境

苜蓿是一种豆科牧草, 栽培面积大且营养丰富。马召稳^[27]发现苜蓿的青贮微生物群落中海洋杆菌属 (*Oceanobacillus*)、乳杆菌属和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为优势菌属。与之不同的是, Ridwan 等^[28]发现苜蓿青贮生物群落优势菌为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、干酪乳杆菌、短乳杆菌、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、黄杆菌 (*Flavobacterium*)。造成这种差异的原因可能是地理位置的不同导致植物表面小气候不同, 影响了微生物区系, 也可能是因为品种的不同。另外, 由于

青贮是一个动态的过程, 自然新鲜的牧草表面附着微生物在组成和数量上都与青贮期间及完成之后差异明显, 而且附着的 LAB 数量在萎蔫过程中会增加一些^[29], 但有研究表明, 苜蓿萎蔫过程没有改变 LAB 数量, 但影响了多样性, 植物乳杆菌是未萎蔫青贮和萎蔫青贮中的优势菌种^[12]。

2.3 不同青贮添加剂对青贮微生物多样性的影响

牧草表面的 LAB 以异型发酵菌为主, 其数量无法达到优质青贮 LAB 数量的最低标准 (10^5 CFU/g FM)^[30], 因此使用青贮添加剂来直接或间接增加 LAB 数量成为近几十年来饲草保存中研究最广泛的方向之一, 其本质是通过调控微生物区系来改善饲草青贮发酵品质及营养特性。

2.3.1 LAB 接种剂

长期以来, LAB 作为青贮饲料接种剂, 可与牧草附着的有害菌竞争营养物质并产生乳酸、乙酸及细菌素等代谢物质, 抑制有害菌的活动与繁殖, 有效地改善发酵品质、保存营养、避免腐败^[31]。因此, 接种外源 LAB 后会抑制牧草本身附着的不利于青贮发酵的真菌及好氧细菌, 抑制效果与牧草本身附着菌的特性及青贮条件有关。

有报道燕麦青贮接种耐低温 LAB 增加了乳杆菌属的相对丰度, 并抑制了不良微生物梭菌的生长, 更好地保存了高水分燕麦青贮的养分^[32]。大麦青贮饲料接种微生物菌剂也有类似的效果, 不良细菌不动杆菌属和普罗威登菌属 (*Providencia*) 等以及酵母菌中的伊萨酵母属 (*Issatchenkia*) 和哈萨克斯坦酵母 (*Kazachstania*) 都受到抑制^[33]。在苋菜 (*Amaranthus spinosus* L.) 和稻草 (*Oryza sativa* L.) 混合青贮中加入植物乳杆菌, 使 LAB 的相对丰度增加, 肠杆菌科的相对丰度降低^[34]; 在绿麦和燕麦青贮的研究中发现, 随着青贮发酵的进行, 早期优势菌群肠球菌的地位在发酵后期被添加剂中的植物乳杆菌所替代, 这有利于在青贮中后期建立稳定的 LAB 群落, 长期保存青贮饲料^[35]。抗菌肽具有有益于消化吸收的氨基酸成分, 因此可作为一种替代抗生素的新型青贮饲料添加剂, 以减少其对动物造成的危害。抗菌肽产生菌可作为调控牧草青贮发酵的新型添加剂^[36], 有报道在苜蓿中添加产抗菌肽枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 发酵后提高了 LAB 的相对丰度, 降低了肠球菌的相对丰度, 改善青贮发酵品质并改变了青贮期间和好氧暴露后的细菌群落^[37]。环境因素会对

外源菌群产生一定的影响,添加剂和较低的室内环境温度组合可以有效提高辣木叶青贮质量^[38]。

芦苇金丝雀草(*Phalaris arundinacea* L.)接种布氏乳杆菌青贮后降低细菌 α 多样性指数,改变青贮饲料中细菌群落的组成,但对青贮发酵和细菌群落组成的影响有限,说明 LAB 接种剂的效果存在差异^[39]。藜草青贮饲料接种植物乳杆菌和布氏乳杆菌后细菌多样性显著下降,细菌组成发生改变,但乳杆菌属的相对丰度并未受到影响,同样也表明接种 LAB 影响有限^[40]。

2.3.2 牧草附生微生物区系的移植

粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)是指健康供体粪便的微生物群落被整体转移到受体体内的过程。因而受体可获得有益细菌,改变肠道菌群组成^[41]。其应用较为广泛,最近的研究发现移植健康成年猪的粪便微生物群落可以明显改变受体仔猪回肠中的菌群结构,增加结肠菌群的 α 多样性。FMT 组仔猪回肠中乳杆菌属的相对丰度减少,棒状杆菌属(*Corynebacterium*)等的相对丰度增加。这说明早期 FMT 能够调节肠道菌群的组成^[42]。而将健康牛犊的粪菌移植到腹泻的牛犊中,可以缓解腹泻,并具有恢复其肠道微生物组成的能力^[43]。

在改善青贮饲料微生物区系方面,菌群移植也可发挥正面作用。移植青贮玉米和本地红三叶草附生菌群均有利于红三叶草青贮发酵品质和微生物群落结构的改善,因此,移植并重建饲草附生微生物区系是一种有效、环保的青贮方法^[44]。用蒸馏水和苏丹草(*Sorghum sudanense*)、饲用高粱(*Sorghum bicolor*)、象草(*Pennisetum purpureum*)和全株玉米(*Zea mays* L.)4种牧草附着微生物对灭菌苏丹草进行青贮,结果表明饲料高粱的附生菌群对苏丹草青贮的微生物群落和发酵特性有积极影响^[23]。

2.3.3 混合青贮

混合青贮是指2种及以上青贮原料混合后制作的青贮饲料。混合青贮的营养成分含量丰富,有利于 LAB 生长繁殖,可以更好地保存青贮饲料营养价值^[45-48]。

添加富含可溶性碳水化合物(water soluble carbohydrates, WSC)的多年生黑麦草可以降低富含蛋白质的构树青贮的 pH 和附生微生物数量,对细菌群落有显著影响,有益微生物如乳杆菌和魏

斯氏菌在整个青贮时间内占主导地位,肠杆菌的数量显著减少。Spearman 秩相关分析表明,构树青贮乳酸含量与乳杆菌和嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)的相对丰度呈正相关,而氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)含量与肠杆菌的相对丰度呈正相关^[45]。混合玉米秸秆增加了启封时乳杆菌的相对丰度(12.96%~50.82%)和暴露于空气后伊萨酵母属的相对丰度(2.02%~36.03%),且一定程度上提高了有氧稳定性。研究表明,混合调制玉米秸秆可以改善稻草青贮饲料的发酵品质和营养成分^[46]。Wang 等^[47]在华北平原进行了类似的研究,玉米与苜蓿混合,随着玉米比例从0增加到40%,理想 LAB 的相对丰度增加,不良根瘤菌和甲基菌数量减少,并使菌群向更便于青贮饲料保存的方向转移。使用发酵全混合日粮(fermentation total mixed ration, FTMR)是一种很有前途的保存饲料的方法,但发酵过程中的变化以及与 FTMR 菌群的联系尚不完全清楚。添加 22% 燕麦青贮(oat silage, OS)的 FTMR,发酵质量显著提高,表现为丁酸浓度降低,乳酸/乙酸降低,LAB 数量增加,腐败酵母死亡速度加快;添加 11% 和 22% OS 后,出现了更多的异型发酵 LAB,如布氏乳杆菌、短乳杆菌和魏氏乳杆菌;此外,添加 22% 的 OS 导致细菌相对丰度和多样性显著增加,以乳杆菌属复合体为主。在 LAB 复合体的物种中,棒状乳杆菌数量与乳酸、粗蛋白质和氨态氮含量呈正相关,表明其在改变发酵结构方面的潜在作用^[48]。

2.3.4 酶接种剂

除了细菌接种剂,酶如纤维素酶(cellulase, CE)、半纤维素酶、果胶酶和淀粉酶等也常常添加在青贮饲料中,尤其是 CE 的应用最为广泛。单独使用 CE 和半乳糖苷酶(galactosidase, GA)以及与植物乳杆菌组合使用的处理大大增加了苜蓿青贮中乳杆菌属的相对丰度^[49];CE 和木聚糖酶用于甜高粱的青贮,可促进乳酸发酵,降低 pH 和微生物多样性,抑制不良微生物,保证青贮质量^[50]。在豆渣与玉米秸秆混合青贮中加入 LAB、CE 和 LAB+CE,发现其细菌组成与对照组差异显著,其中 LAB+CE 组乳杆菌属数量显著高于其他组,不良菌数量显著低于其他组^[51]。当植物乳杆菌和/或 CE 对高水分苋菜、稻秸混合青贮时,添加剂提高了乳杆菌属的相对丰度,降低了魏斯氏菌属、片球菌属、乳球菌的相对丰度。综合来看,以植物乳杆

菌和纤维素酶混合处理青贮品质最好^[52]。

2.3.5 有机酸

青贮饲料厌氧发酵过程中可产生乳酸、乙酸等有机酸,抑制腐败相关细菌和真菌的生长,并有效保存青贮营养物质^[3],但有机酸作为青贮添加剂对青贮微生物的影响报道较少。有研究比较了一年生黑麦草和苜蓿青贮中添加 LAB 接种剂 (LABi, 10^6 CFU/g) 和甲酸 (FA, 3 mL/kg) 的效果,结果发现 2 种添加剂均能降低其微生物多样性,提高青贮品质^[53];He 等^[46]研究发现,丙酸的加入可以抑制辣木叶青贮和暴露在空气中的微生物群落和脱酰胺活性。柠檬酸 (citric acid, CA) 是一种食品添加剂,添加 CA 可以提高砂仁叶片青贮饲料中 LAB、片球菌和乳杆菌的相对丰度,降低大肠埃氏菌属-志贺氏菌属、肠杆菌属和泛菌属等不良微生物的相对丰度^[54];在对王草 (king grass, KG) 的研究中发现,植物乳杆菌和 CA 处理使 KG 青贮细菌多样性降低,乳杆菌属的相对丰度增加,不良菌属假单胞菌属的相对丰度降低,进而提高发酵品质^[55];在青贮木薯叶 (cassava foliage, CF) 中添加 CA、苹果酸 (malic acid, MA) 及其与植物乳杆菌混合添加,发现青贮饲料品质改善,微生物群落中类芽孢杆菌 (平均 27.81%) 和芽孢杆菌含量 (平均 16.04%) 提高,说明 CA 和 MA 可提高 CF 青贮品质,且与植物乳杆菌组合效果更佳^[56]。没食子酸 (gallic acid, GA) 可以作为一种绿色添加剂,在桑叶和柱花草 (*Stylosanthes guianensis*) 青贮饲料中添加 GA,梭菌属和肠杆菌属的相对丰度降低,乳酸杆菌属的相对丰度增加^[57];另外还发现 GA 提高了辣木叶的青贮品质、氨肽酶活性和抗氧化能力,其青贮微生物组成也随之发生变化^[58]。单宁酸 (tannic acid, TA) 是一种广泛存在于植物中的多酚,具有抗菌特性和与蛋白质结合的能力,在桑叶和柱花草青贮中添加不同比例 TA,均改善了桑叶和柱花草青贮的品质,增加了魏斯氏菌属、不动杆菌属的相对丰度,降低了梭菌属的相对丰度,其中以 2% TA 为适宜的添加浓度^[59];在团花树叶 (*Neolamarckia cadamba* leaf, NCL; 富含 TA) 单独青贮或添加聚乙二醇 (单宁失活剂) 青贮的研究中发现,添加聚乙二醇处理优势微生物群落为乳杆菌属取代。这表明添加聚乙二醇使该原料本身的单宁失活,促进了青贮饲料的乳酸发酵并抑制蛋白质降解^[60]。

3 小结与展望

无论是饲草本身附着的还是外源添加的微生物,其组成和数量都决定着发酵过程中的青贮微生物群落结构和演替,进而影响青贮发酵品质。不同区域的环境因素、饲草种类以及青贮添加剂类型都不同程度地影响着饲草青贮微生物多样性。目前的研究集中在常规青贮添加剂产生的影响,未来应更多的研究新型绿色添加剂,如具有活性成分的植物提取物、具有抑菌活性的代谢产物以及乡土益生微生物资源及其组合利用。另外,青贮研究手段随着三代测序、代谢组、宏基因组和宏转录组等技术的成熟与应用,在种水平鉴定优良青贮微生物,通过差异代谢物、差异基因表达、功能基因和代谢调控网络的构建等,阐明微生物在青贮发酵中的作用及其对青贮添加剂的响应机制,为青贮发酵品质的调控、新型青贮添加剂的研发提供科学依据。

参考文献:

- [1] THOMPSON D J, BEEVER D E, LONSDALE C R, et al. The digestion by cattle of grass silage made with formic acid and formic acid-formaldehyde [J]. The British Journal of Nutrition, 1981, 46(1): 193-207.
- [2] P. K.. Microbiology series Wooford M. K., 1 vol (16×23 cm), 350+xii pages, the silage fermentation, Vol. 14, Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1984) [J]. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie, 1984, 135(3, Suppl. B): 363-364.
- [3] JONES D J C. The Biochemistry of silage (2nd edn), by p. McDonald, A. R. Henderson & S. J. E. Heron. 340 pp. Kingston, Kent: Chalcombe Publications (1991). £ 49.50 (UK) £ 55.00 (elsewhere) (hardback). ISBN 0 948617 22 5. [J]. The Journal of Agricultural Science, 1991, 117(3): 386.
- [4] CAI Y, BENNO Y, OGAWA M, et al. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(3): 520-526.
- [5] LIN C, BOLSEN K K, BRENT B E, et al. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn [J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(9): 2484-2493.
- [6] MCALLISTER T A, DUNIÈRE L, DROUIN P, et al. Silage review: using molecular approaches to define

- the microbial ecology of silage[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4060–4074.
- [7] PARVIN S, NISHINO N. Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodesgrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Grassland Science*, 2010, 56(1): 51–55.
- [8] HOLZER M, MAYRHUBER E, DANNER H, et al. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 282–287.
- [9] ÁVILA C L S, CARVALHO B F. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 966–984.
- [10] DING Z T, BAI J, XU D M, et al. Microbial community dynamics and natural fermentation profiles of ensiled alpine grass *Elymus nutans* prepared from different regions of the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 855.
- [11] 保安安. 青藏高原不同地区垂穗披碱草青贮饲料中乳酸菌多样性及优势菌种的发酵特性研究[D]. 硕士学位论文. 兰州: 兰州大学, 2016.
- BAO A A. Study on biodiversity and fermentation characteristics of lactic acid bacteria in *Elymus nutans* silage ensiled at different areas of the Qinghai-Tibetan Plateau[D]. Master's Thesis. Lanzhou: Lanzhou University, 2016. (in Chinese)
- [12] AGARUSSI M C N, PEREIRA O G, DA SILVA V P, et al. Fermentative profile and lactic acid bacterial dynamics in non-wilted and wilted alfalfa silage in tropical conditions[J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(1): 451–460.
- [13] LI D X, NI K K, ZHANG Y C, et al. Fermentation characteristics, chemical composition and microbial community of tropical forage silage under different temperatures[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(5): 665–674.
- [14] 顾娴, 李晓敏, 王国栋, 等. 北方地区青贮玉米优良乳酸菌筛选以及初步应用[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2020, 50(6): 44–48.
- GU X, LI X M, WANG G D, et al. Screening and preliminary application of excellent lactic acid bacteria for silage maize in northern China[J]. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 50(6): 44–48. (in Chinese)
- [15] 卢强, 孙林, 任志花, 等. 发酵时间对苜蓿青贮品质和微生物群落的影响[J]. *中国草地学报*, 2021, 43(1): 111–117.
- LU Q, SUN L, REN Z H, et al. Dynamic analysis of nutritional quality and microbial community of alfalfa silage[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2021, 43(1): 111–117. (in Chinese)
- [16] 任海伟, 王莉, 朱朝华, 等. 白酒糟与菊芋渣混合青贮发酵品质及微生物菌群多样性[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(15): 235–244.
- REN H W, WANG L, ZHU C H, et al. Ensiling co-fermentation quality and microbial community diversity of grain stiller and inulin processing residue from *Helianthus tuberosus*[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(15): 235–244. (in Chinese)
- [17] 刘蓓一, 宦海琳, 顾洪如, 等. 不同发酵时期大麦青贮品质和微生物多样性变化[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(3): 653–660.
- LIU B Y, HUAN H L, GU H R, et al. Changes of silage quality and microbial diversity in barley during different fermentation periods[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 35(3): 653–660. (in Chinese)
- [18] 梁辛, 唐庆凤, 郭艳霞, 等. 甘蔗梢自然青贮过程中的营养成分及细菌多样性变化规律[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(12): 3547–3554.
- LIANG X, TANG Q F, GUO Y X, et al. Nutrient and bacterial diversity changes of natural fermented sugarcane tops silage[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(12): 3547–3554. (in Chinese)
- [19] LI M, LV R L, ZHANG L D, et al. Melatonin is a promising silage additive: evidence from microbiota and metabolites[J]. *Frontiers in microbiology*, 2021, 12: 670764.
- [20] 赵继丽. 三江源试验区不同燕麦混播草地微生物区系分析和低温乳酸菌的筛选及利用[D]. 硕士学位论文. 西宁: 青海大学, 2019.
- ZHAO J L. Analysis of microflora of different oat mixed broadcast grassland in Sanjiangyuan experimental area and screening and utilization of low temperature lactic acid bacteria[D]. Master's Thesis. Xining: Qinghai University, 2019. (in Chinese)
- [21] MUCK R E. Initial bacteria numbers on lucerne prior to ensiling[J]. *Grass and Forage Science*, 1989, 44(1): 19–25.
- [22] MURARO G B, DE ALMEIDA CARVALHO-ES-TRADA P, DE OLIVEIRA PASETTI M H, et al. Bac-

- terial dynamics of sugarcane silage in the tropics [J/OL]. *Environmental Microbiology*, 2021. (2021-02-15) [2021-04-10]. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15428>. DOI: 10.1111/1462-2920.15428.
- [23] NAZAR M, WANG S R, ZHAO J, et al. Abundance and diversity of epiphytic microbiota on forage crops and their fermentation characteristic during the ensiling of sterile *Sudan* grass [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(2): 27.
- [24] ZHANG Y C, LI D X, WANG X K, et al. Fermentation dynamics and diversity of bacterial community in four typical woody forages [J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(3): 233-240.
- [25] YANG L, YUAN X, LI J, et al. Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 275: 280-287.
- [26] HE L, CHEN N, LV H, et al. Gallic acid influencing fermentation quality, nitrogen distribution and bacterial community of high-moisture mulberry leaves and stylo silage [J]. *Bioresource Technology*, 2020. 295: 122255.
- [27] 马召稳. 青贮苜蓿中主要微生物的筛选、鉴定与应用 [D]. 硕士学位论文. 洛阳: 河南科技大学, 2019.
- MA Z W. Screening identification and application of main microorganisms in alfalfa silage [D]. Master's Thesis. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2019. (in Chinese)
- [28] RIDWAN R, RUSMANA I, WIDYASTUTI Y, et al. Fermentation characteristics and microbial diversity of tropical grass-legumes silages [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(4): 511-518.
- [29] MCENIRY J, O' KIELY P, CLIPSON N J W, et al. Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2): 359-371.
- [30] BEN-DOV E, SHAPIRO O H, SIBONI N, et al. Advantage of using inosine at the 3 termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 6902-6906.
- [31] WEINBERG Z G, MUCK R E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19(1): 53-68.
- [32] CHEN L Y, BAI S Q, YOU M H, et al. Effect of a low temperature tolerant lactic acid bacteria inoculant on the fermentation quality and bacterial community of oat round bale silage [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 269: 114669.
- [33] LIU B Y, YANG Z Q, HUAN H L, et al. Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5342.
- [34] MU L, XIE Z, HU L, et al. *Lactobacillus plantarum* and molasses alter dynamic chemical composition, microbial community, and aerobic stability of mixed (amaranth and rice straw) silage [J/OL]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021. (2021-02-21) [2021-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33611793/>. DOI: 10.1002/jsfa.11171.
- [35] 王思然. 添加乳酸菌对西藏绿麦和燕麦青贮发酵品质及微生物多样性的影响 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2016.
- WANG S R. Effects of adding lactic acid bacteria on fermentation quality and microbial diversity of green wheat and oats in Tibet [D]. Master's Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [36] 王天威, 曹艳红, 杨果, 等. 乳酸菌对青贮品质及草食家畜健康的影响 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2020, 50(9): 927-938.
- WANG T W, CAO Y H, YANG G, et al. Effects of lactic acid bacteria on the quality of silage and health of ruminants [J]. *Science in China (Life Sciences)*, 2020, 50(9): 927-938. (in Chinese)
- [37] BAI J, XU D M, XIE D M, et al. Effects of antibacterial peptide-producing *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability, and microbial community of alfalfa silage [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123881.
- [38] ZHANG Q, YU Z, WANG X G, et al. Effects of inoculants and environmental temperature on fermentation quality and bacterial diversity of alfalfa silage [J]. *Animal Science Journal*, 2018, 89(8): 1085-1092.
- [39] CHEN L, CAI Y, LI P, et al. Inoculation of exogenous lactic acid bacteria exerted a limited influence on the silage fermentation and bacterial community compositions of reed canary grass straw on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(5): 1163-1172.
- [40] 陆永祥, 陈良寅, 陈仕勇, 等. 乳酸菌对青藏高原藜草

- 青贮饲料发酵品质和细菌群落的影响[J].草学, 2020(5):16-24.
- LIU Y X, CHEN L Y, CHEN S Y, et al. Effects of lactic acid bacteria on stage fermentation and bacterial community of *Phalaris* L. on the Qinghai Tibetan Plateau [J]. Prataculture & Animal Husbandry, 2020 (5):16-24. (in Chinese)
- [41] HO J T K, CHAN G C F, LI J C B. Systemic effects of gut microbiota and its relationship with disease and modulation[J]. BMC Immunology, 2015, 16:21.
- [42] 张卓, 黄金秀, 杨飞云, 等. 早期粪菌移植对仔猪肠道发育、肠道菌群组成和肠道激素分泌的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(7):3745-3758.
- ZHANG Z, HUANG J X, YANG F Y, et al. Effects of early fecal microbiota transplantation on intestinal development, intestinal microbiota composition and intestinal hormone secretion of piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(7):3745-3758. (in Chinese)
- [43] KIM H S, WHON T W, SUNG H, et al. Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance[J]. Nature Communications, 2021, 12(1):161.
- [44] ALI N, WANG S R, ZHAO J, et al. Microbial diversity and fermentation profile of red clover silage inoculated with reconstituted indigenous and exogenous epiphytic microbiota[J]. Bioresource Technology, 2020, 314:123606.
- [45] DONG L F, ZHANG H S, GAO Y H, et al. Dynamic profiles of fermentation characteristics and bacterial community composition of *Broussonetia papyrifera* ensiled with perennial ryegrass[J]. Bioresource Technology, 2020, 310:123396.
- [46] HE L W, ZHOU W, XING Y Q, et al. Improving the quality of rice straw silage with *Moringa oleifera* leaves and propionic acid: fermentation, nutrition, aerobic stability and microbial communities [J]. Bioresource Technology, 2020, 299:122579.
- [47] WANG M S, GAO R, FRANCO M, et al. Effect of mixing alfalfa with whole-plant corn in different proportions on fermentation characteristics and bacterial community of silage[J]. Agriculture, 2021, 11(2):174.
- [48] YANG H, WANG B, ZHANG Q, et al. Improvement of fermentation quality in the fermented total mixed ration with oat silage [J]. Microorganisms, 2021, 9(2):420.
- [49] HU Z F, MA D Y, NIU H X, et al. Enzyme additives influence bacterial communities of *Medicago sativa* silage as determined by Illumina sequencing [J]. AMB Express, 2021, 11(1):5.
- [50] 冯银萍. 添加剂对甜高粱青贮品质及生物降解能力的影响[D]. 硕士学位论文. 兰州: 兰州理工大学, 2020.
- FENG Y P. Effects of additives on ensiling quality and biodegradability of sweet sorghum silages [D]. Master's Thesis. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2020. (in Chinese)
- [51] ZHAO C, WANG L H, MA G M, et al. Cellulase interacts with lactic acid bacteria to affect fermentation quality, microbial community, and ruminal degradability in mixed silage of soybean residue and corn stover[J]. Animals, 2021, 11(2):334.
- [52] MU L, XIE Z, HU L X, et al. Cellulase interacts with *Lactobacillus plantarum* to affect chemical composition, bacterial communities, and aerobic stability in mixed silage of high-moisture amaranth and rice straw [J]. Bioresource Technology, 2020, 315:123772.
- [53] 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 [J]. Animal Feed Science and Technology, 2019, 247:285-293.
- [54] LV H J, PIAN R Q, XING Y Q, et al. Effects of citric acid on fermentation characteristics and bacterial diversity of *Amomum villosum* silage [J]. Bioresource Technology, 2020, 307:123290.
- [55] ZI X J, LI M, CHEN Y Y, et al. Effects of citric acid and *Lactobacillus plantarum* on silage quality and bacterial diversity of king grass silage [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:631096.
- [56] LI M, ZHANG L D, ZHANG Q, et al. Impacts of citric acid and malic acid on fermentation quality and bacterial community of cassava foliage silage [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:595622.
- [57] HE L W, CHEN N, LV H J, et al. Gallic acid influencing fermentation quality, nitrogen distribution and bacterial community of high-moisture mulberry leaves and stylo silage [J]. Bioresource Technology, 2020, 295:122255.
- [58] HE L W, LV H J, CHEN N, et al. Improving fermentation, protein preservation and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves silage with gallic acid and tannin acid [J]. Bioresource Technology, 2020, 297:122390.

- [59] WANG C, PIAN R Q, CHEN X Y, et al. Beneficial effects of tannic acid on the quality of bacterial communities present in high-moisture mulberry leaf and stylo silage [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 586412.
- [60] HE L W, LV H J, XING Y Q, et al. Intrinsic tannins affect ensiling characteristics and proteolysis of *Neolamarckia cadamba* leaf silage by largely altering bacterial community [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 311: 123496.

Research Progress and Countermeasure on Microbial Diversity of Forage Silage

LIU Yue¹ ZI Xuejuan^{1*} CHEN Ting¹ LI Mao²

(1. College of Forestry, Hainan University, Danzhou 571737, China; 2. Institute of Tropical Crop Variety Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: One of the key factors affecting silage fermentation characteristics is the microbial community structure and succession characteristics on the forage surface. The microbial species on the surface of forages from different regions and different species are quite different, which makes the fermentation characteristics diverse. The microbial community structure and its succession process are not only affected by the microorganisms attached to the forage surface, and the role of exogenous silage additives can not be ignored. This paper summarized the microbial community structure and succession law of forage silage in different regions and different species, and the effects of silage additives on microbial community. Generally speaking, different regional environment, different forage species and different silage additives all effect the microbial diversity of silage and lead to the difference of silage fermentation quality. In order to obtain high-quality silage, environmental factors, forage characteristics and additive types must be comprehensively considered, it is suggested to make different silage for different forages. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(11): 6084-6092]

Key words: silage; microbial diversity; environmental factors; silage additives; forage

* Corresponding author, associate professor, E-mail: zixuejuan@163.com