

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.01.033

引用格式:张超,尹含雪,麦章威,等.柠檬醛对全株玉米青贮饲料中黄曲霉菌的影响[J].草地学报,2026,34(1):348–355
ZHANG Chao, YIN Han-xue, MAI Zhang-wei, et al. The Effect of Citral on *Aspergillus flavus* in Whole-crop Corn Silage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(1):348–355

柠檬醛对全株玉米青贮饲料中黄曲霉菌的影响

张超,尹含雪,麦章威,姚旋*

(华南农业大学林学与风景园林学院,广东木本饲料工程技术研究中心,广东省森林植物种质创新与利用重点实验室,广东广州510642)

摘要:本研究旨在探究柠檬醛(Citral,C)对全株玉米青贮饲料中黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)生长及黄曲霉毒素B1(AFB1)合成的抑制作用。试验以乳熟期全株玉米为材料,青贮90天后接种黄曲霉孢子(1.0×10^7 cfu·g⁻¹),并添加0.4 mL·kg⁻¹柠檬醛(C组),以未添加组为对照(CK组)。通过测定最小抑菌浓度(MIC)、菌丝干重、菌落直径及有氧暴露后的发酵参数、微生物数量和AFB1含量,评估柠檬醛的抑菌效果。结果表明,柠檬醛对黄曲霉的MIC为0.4 μL·mL⁻¹,显著抑制菌丝生长和孢子萌发($P < 0.05$)。有氧暴露7天后,C组AFB1含量低于检测限(0.05 μg·kg⁻¹),而CK组为3.66 μg·kg⁻¹。此外,柠檬醛显著降低了大肠杆菌、酵母菌及有害真菌(如曲霉属)的丰度($P < 0.05$),同时减缓了pH上升和干物质损失。因此,柠檬醛能有效抑制黄曲霉生长及AFB1合成,改善青贮饲料的有氧稳定性,本研究为植物源抑菌剂的开发提供了理论依据。

关键词:柠檬醛;黄曲霉;全株玉米青贮;有氧暴露

中图分类号:S816.5+3

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)01-0348-08

The Effect of Citral on *Aspergillus flavus* in Whole-crop Corn Silage

ZHANG Chao, YIN Han-xue, MAI Zhang-wei, YAO Xuan*

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangdong Province Research Center of Wood Forage Engineering Technology, Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou, Guangdong Province 510642, China)

Abstract: This study aimed to investigate the inhibitory effects of citral (Citral, C) on the growth of *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) and the synthesis of aflatoxin B1 (AFB1) in whole-plant corn silage. The experiment used whole-plant corn at the milk stage as the material, which was ensiled for 90 days and then inoculated with *A. flavus* spores (1.0×10^7 cfu·g⁻¹). Citral was added at 0.4 mL·kg⁻¹ (C group), with an untreated group as the control (CK group). The antifungal activity of citral was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), mycelial dry weight, colony diameter, fermentation parameters, microbial counts, and the AFB1 content after aerobic exposure. The results showed that the MIC of citral against *A. flavus* was 0.4 μL·mL⁻¹, significantly inhibiting mycelial growth and spore germination ($P < 0.05$). After 7 days of aerobic exposure, the AFB1 content in the C group was below the detection limit (0.05 μg·kg⁻¹), while it reached 3.66 μg·kg⁻¹ in the CK group. Additionally, citral significantly reduced the abundance of *E. coli*, yeasts, and harmful fungi (e.g., *Aspergillus*) ($P < 0.05$), while mitigating pH increase and dry matter loss. In conclusion, citral effectively suppressed *A. flavus* growth and AFB1 synthesis, improving the aerobic stability of silage, thereby providing a theoretical basis for the development of plant-derived antifungal agents.

Key words: Citral; *Aspergillus flavus*; Whole-crop corn silage; Aerobic exposure

收稿日期:2024-11-04;修回日期:2024-04-15

基金项目:梅州市科技计划项目(2024A0301041);广东长隆慈善基金会(CLPF2021007Z)资助

作者简介:张超(1997-),男,汉族,江苏宿迁人,硕士研究生,主要从事牧草青贮加工研究, E-mail: chaozhangscau@163.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: yaoxuan@scau.edu.cn

由全株玉米厌氧发酵制成的青贮饲料含有丰富的营养和能量,是世界各地牛、羊、马等动物饲料的重要组成部分^[1-2]。据报道,全株玉米青贮饲料可占奶牛日粮粗饲料的80%^[3]。然而,由于在饲喂的过程中饲料的残留和管理不善,青贮饲料很容易发生有氧变质。青贮饲料的有氧变质不仅会导致重要营养成分的大量损失,降低反刍动物的营养摄入和生产力,还会增加霉菌等不良微生物增殖的风险^[4-5]。霉菌代谢产生的黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFBs)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)、呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON)和伏马毒素(Fumonisin, FBS)等霉菌毒素更是对动物造成损害,甚至威胁人类健康^[6]。其中,由黄曲霉产生的黄曲霉毒素B1(AFB1)是危害最大的霉菌毒素,且AFB1在乳腺组织和瘤胃中也可代谢产生黄曲霉毒素M1(AFM1)并进入乳汁中,对人类健康造成危害^[7-8]。因此,寻找安全可靠的抗真菌药物控制黄曲霉污染对畜牧业的发展和食品安全至关重要。

与化学杀菌剂相比,植物源杀菌剂因其可持续性和生物降解性而受到全球关注。植物精油是芳香植物的次级代谢产物,具有广谱的抗菌活性。陈德奎等^[9]研究发现砂仁精油可以减少紫花苜蓿青贮中的大肠杆菌的数量,有效改善紫花苜蓿青贮的发酵品质和营养品质。黄梁木叶精油可以降低柱花草和水稻秸秆青贮饲料中大肠菌群数量,提高了水稻秸秆青贮饲料的乳酸和真蛋白含量^[10]。一些天然化学物质,如百里酚、肉桂醛等^[11],已被验证为潜在的抗真菌药物,并已获得美国食品和药物管理局的批准。柠檬醛作为天然植物源提取物的有效成分,具有抗菌活性强、成本低、来源广等优点,具有较大的开发前景。已有研究表明,柠檬醛可以通过破坏细胞膜完整性,从而抑制黄曲霉的生长和AFB1的合成^[11]。艾淑娜等^[12]通过研究发现柠檬醛可以有效抑制菌丝生长、破坏黄曲霉细胞膜的完整性,并且在防控花生黄曲霉污染中展示了良好的效果。目前对柠檬醛防控黄曲霉污染主要集中在谷物中,在青贮饲料中的应用较少,因此,本试验研究了柠檬醛对全株玉米青贮饲料感染黄曲霉有氧暴露的影响,评估柠檬醛作为防腐剂在全株玉米青贮饲料中的霉菌减效效应,为天然植物源抑菌剂的开发与应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所选用的全株玉米种植于华南农业大

学启林北试验田(23°19'N, 113°34'E)。黄曲霉GDMCC 3.493来自广东省微生物菌种保藏中心。柠檬醛购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 试验设计

本试验首先测定柠檬醛对黄曲霉的抑制效果,随后于2022年6月取乳熟期的全株玉米,用粉碎机将采集材料揉搓粉碎成1~2 cm的小段,混合均匀后,每个青贮袋装入1 kg全株玉米,用真空封口机密封。青贮90 d后,接种黄曲霉孢子(1.0×10^7 cfu·g⁻¹),混合均匀。按0.4 mL·kg⁻¹比例添加柠檬醛(C),并设立空白对照(CK)。不同处理组样品混合均匀后,分别取1 kg装入5 L塑料桶,用一层聚乙烯塑料薄膜覆盖桶,扎出气孔,一共2个处理组,每组6个重复,在室温保存。在有氧暴露第0、3和7 d采样对进行发酵参数和微生物群落分析。其中在有氧暴露第7 d,测定饲料中AFB1含量。

1.3 测定指标

1.3.1 黄曲霉孢子悬液的制备 将黄曲霉接种至PDA培养基上,28℃恒温培养5 d,用无菌生理盐水冲洗收集霉菌孢子,4层无菌纱布过滤除去菌丝,计数并将孢子浓度调至 1×10^7 cfu·mL⁻¹备用。

1.3.2 柠檬醛对黄曲霉的体外抗真菌活性 根据Xu等^[13]描述的方法测试柠檬醛对黄曲霉的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。黄曲霉孢子悬浮液接种到终浓度为 10^5 cfu·mL⁻¹的马铃薯葡萄糖液体培养基(Potato dextrose broth, PDB)中,将孢子培养基分配到96孔板中。然后将柠檬醛加入孔中,最终浓度分别为0, 0.006 25, 0.012 5, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8和1.6 μL·mL⁻¹。28℃下孵育48 h后,通过微孔板读数器(Thermol, Variskan Flash)在600 nm处检测每个孔中的光密度,以澄清无浑浊孔对应的最小浓度为柠檬醛的MIC值。

根据Hu等^[14]的研究方法,将1 mL黄曲霉孢子悬浮液接种到100 mL不同浓度(0, 0.1, 0.2, 0.3和0.4 μL·mL⁻¹)的柠檬醛PDB中。在(28±1)℃和200转下孵育5 d,最后将菌丝体过滤,80℃下干燥12 h后测定菌丝体干重。根军Li等^[15]的研究方法,将1 μL黄曲霉孢子悬浮液接种到含有有15 mL马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的无菌培养皿中心(直径86 mm)。将不同剂量的(0, 1, 2, 4 μL·mL⁻¹)

柠檬醛加入培养皿盖中,使最终浓度达到(0, 0.0156, 0.0313和0.0626 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将培养皿用薄膜密封,在28℃下孵育5 d。采用交叉法测量黄曲霉的菌落直径。

1.3.3 发酵参数和微生物数量测定 根据杨丹等^[16]所述,分别在有氧暴露后的第0 d、第3 d和第7 d测定了青贮样品的发酵参数和微生物数量。取适量样品,称重记录,置于65℃恒温干燥箱烘干48 h,计算样品烘干后的重量与烘干前的重量的百分比即为干物质含量。取10 g鲜样加入90 mL纯水于4℃冰箱充分泡,24 h后取出用定性滤纸过滤,使用雷磁pHS-3C型pH计(上海市精密科学仪器有限公司)测定滤液pH值。将10 g的鲜样加入90 mL无菌生理盐水,摇晃混匀,将上清液从 10^{-1} 梯度逐层稀释至 10^{-6} 倍,用平板计数法测定乳酸菌、大肠杆菌和酵母菌和霉菌的数量。

1.3.4 AFB₁的检测 提取:采用液相色谱-串联质谱法测定有氧暴露7 d后AFB₁含量。称取饲料样品5 g,精确至0.0001 g,置于50 mL离心管中,加入1 g氯化钠,分别加入适量霉菌毒素同位素内标标准储备溶液振荡混匀后静置2 h,准确加入20 mL乙腈-水溶液,涡旋震荡30 min。然后以8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心10 min,准确移取5.0 mL上清液并加入45.0 mL的pH 7.0 PBS溶液稀释,再次以8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心10 min,量取20 mL上清液,备用。

净化:将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。弃去柱内残液后,控制流速在1~2滴每秒,使20 mL滤液完全过柱,至柱内出现气柱界面。注入10 mL超纯水,维持相同流速淋洗亲和柱,直至柱内液体排尽形成气柱界面,以去除非特异性吸附杂质。采用3 mL甲醇-乙酸混合溶液(体积比依据方法优化参数),以1滴每秒流速进行洗脱,收集全部洗脱液至刻度试管。在50℃水浴条件下,以温和氮

气流吹至近干;加入1 mL甲醇-水溶液,涡旋振荡充分溶解残留物;经0.22 μm 有机系滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中以备进样。

液相色谱参考条件列出如下:

色谱柱:C18柱(柱长100 mm,柱内径2.1 mm,填料粒径1.7 μm),或相当者;色谱柱柱温:50℃;流动相:0.05%甲酸-甲醇溶液和含0.15%甲酸的10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液;梯度洗脱,参见表1;流速:0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积:10 μL 。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

Table 1 Liquid Chromatography Gradient Elution Conditions

时间 Time/min	流动相 A Mobile phase A/%	流动相 B Mobile phase B/%
	0.05% 甲酸-甲醇溶液	0.15% 甲酸的 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液
0	15	85
0.5	15	85
4	100	0
7	100	0
7.1	15	85
10	15	85

质谱参考条件列出如下:

检测方式:多离子反应监测(MRM);离子源控制条件:参见表2;离子选择参数,见表3。

表 2 离子源控制条件

Table 2 Ion Source Control Conditions

电离方式 Ionization method	ESI ⁺
源温 Source temperature/℃	325
干燥气流量 Drying gas flow rate/($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	5
喷雾气压力 Nebulizer gas pressure/psi	55
鞘气温度 Sheath gas temperature/℃	400
鞘气流量 Sheath gas flow rate/($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	12
喷雾电压 Spray voltage/V	4000
电子倍增管电压 Electron multiplier voltage/V	400

表 3 质谱条件参数

Table 3 Mass spectrometry condition parameters

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	母离子 Precursor ion/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$)	子离子 Product ion/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$)	碰撞电压 Collision voltage/V	碰撞能量 Collision energy/eV
AFB ₁	4.370	313.1	241 ⁺ /285	125	24/38

注:*代表定量离子

Note:* represents quantitative ions

1.3.5 微生物丰度测定 使用DNA分离试剂盒(Omega Biotek, Norcross, GA, U. S.)。使用引物341F (5'-ACTCCTACGGGAGWGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3')

扩增细菌16S rDNA的V3+V4区ITS3_KYO2 (5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增真菌ITS的ITS2区。PCR反应体系为50 μL ,其中5 μL

的 $10\times$ KOD 缓冲液; $5\text{ }\mu\text{L}$ 的 2.5 mM dNTPs; $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 引物 ($5\text{ }\mu\text{M}$); $1\text{ }\mu\text{L}$ KOD 聚合酶; 100 ng 模板 DNA。将纯化后的扩增产物连接测序接头, 构建测序文库, Illumina Hiseq2500 测序系统进行测序^[17]。

1.4 数据统计与分析

用 Excel2016 对数据进行处理, SPSS23.0 对整理好的数据进行单因素方差分析, 使用邓肯极差法对各个样本均值之间的差异多重比较, $P<0.05$ 为差异显著。使用 GraphPadPrism8、AdobeIllustratorCC2018 进行绘制图表。

2 结果与分析

2.1 柠檬醛对黄曲霉的体外抑菌效果

为了研究柠檬醛对黄曲霉的抗真菌活性, 在 PDB 中用不同浓度的柠檬醛处理孢子 48 h。如图 1 所示, 柠檬醛对黄曲霉的生长具有剂量依赖性的抑制作用。当柠檬醛的浓度超过 $0.4\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 没有观察到明显的菌丝体。因此, 柠檬醛对黄曲霉孢子的 MIC 为 $0.4\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。图 2 显示了在 PDB 中培养 5 d 烘干后的菌丝体干重, 随着柠檬醛浓度的增加, 菌丝体干重显著降低 ($P<0.05$), 柠檬醛的浓度与菌丝体的干重呈负相关。在气体中培养 5 d 后的菌落直径如图 3 所示, 黄曲霉的菌落直径随着柠檬醛浓度的增加而显著减小 ($P<0.05$), 柠檬醛的浓度与菌落直径呈负相关。因此, 柠檬醛对黄曲霉的生长具有有效的抑制作用。

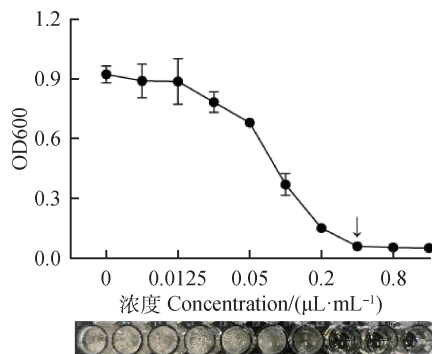


图1 柠檬醛对黄曲霉的最小抑菌浓度(MIC)

Fig. 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) of citral against *A. flavus*

2.1 柠檬醛对全株玉米青贮中黄曲霉的抑制效果

如图 4 所示, 有氧暴露 3 d 后, 与 CK 组相比, 柠檬醛处理组的全株玉米青贮有氧腐败程度明显减

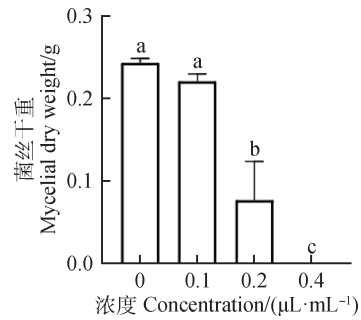


图2 柠檬醛对黄曲霉菌丝干重的影响

Fig. 2 Effect of citral on mycelial dry weight of *A. flavus*
注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: The different small letters in the samerow mean the significant differences ($P<0.05$)

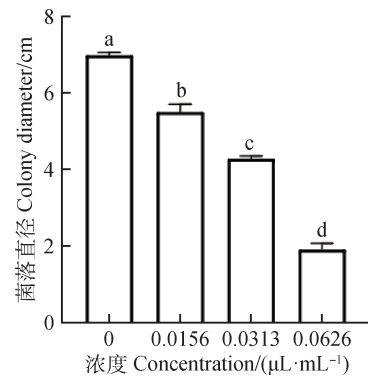


图3 柠檬醛对黄曲霉菌落直径的影响

Fig. 3 Effect of citral on colony diameter of *A. flavus*
注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: The different lower case letters in the samerow mean the significant differences ($P<0.05$)

弱。有氧暴露 7 d 后, CK 组中出现大量的黄曲霉, 柠檬醛处理组中的黄曲霉数量较少。通过检测有氧暴露 7 d 后饲料中的 AFB1 含量, 发现 CK 组中的 AFB1 的含量为 $3.66\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 柠檬醛处理组中的 AFB1 含量均低于检测值 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (图 5)。这些结果表明, 添加 $0.4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬醛可以有效抑制全株玉米青贮中黄曲霉的生长和 AFB1 的合成。

2.2 柠檬醛处理全株玉米青贮有氧暴露后发酵参数和微生物数量

如表 4 所示, 有氧暴露 3 d 之后 CK 组的干物质含量从青贮 90 d 后的 24.18% 下降到 23.05%, 有氧暴露 7 d 后干物质含量降低到 21.89; 添加 $0.4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬醛的全株玉米青贮在有氧暴露 3 d 之后干物质从 24.18% 下降到 22.64%, 有氧暴露 7 d 之后干物质下降到 21.12%。有氧暴露后, CK 组和柠檬醛处理组的 pH 均上升; 与 CK 组的相比, 有氧

暴露 3d 后,添加 0.4 mL·kg⁻¹ 柠檬醛组的 pH 显著低于 CK 组($P<0.05$)。

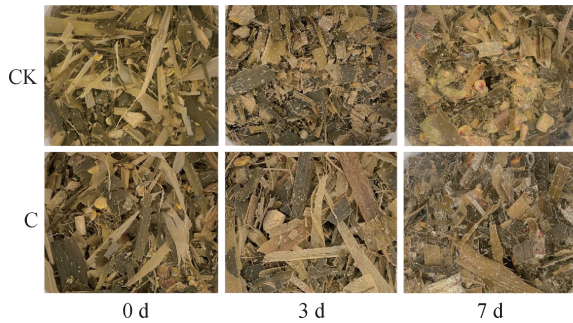


图 4 有氧暴露后的全株玉米青贮中黄曲霉的增殖

Fig. 4 Proliferation of *A. flavus* in whole plant corn silage after aerobic exposure

注:CK,对照组;C,柠檬醛处理组

Note:CK,control;C,Citral treatment

全株玉米青贮有氧暴露后乳酸菌数量显著升高,CK 组与添加柠檬醛处理组无明显差异。与 CK 组相比,柠檬醛处理组,显著降低了大肠杆菌数量($P<0.05$)。全株玉米青贮 90 天后含有较多的酵母菌(4.12 lg cfu·g⁻¹ FM),且有氧暴露后酵母菌的数

量进一步增加,与 CK 组相比添加柠檬醛可以有效抑制酵母菌的增殖($P<0.05$)。全株玉米青贮有氧暴露后霉菌数量增高,CK 组和柠檬醛处理组在 3 d 的霉菌数量均 <2 lg cfu·g⁻¹ FM;在第 7 d 时,霉菌显著增加($P<0.05$),CK 组与柠檬醛处理组并无显著差异。

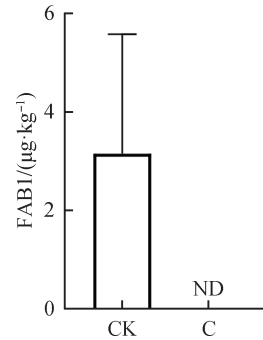


图 5 有氧暴露 7d 后全株玉米青贮中黄曲霉毒素 B1 含量

Fig. 5 Aflatoxin B1 content in whole plant corn silage after 7 days of aerobic exposure

注:CK,对照组;C,柠檬醛处理组;ND,未检测到

Note:CK,contro;C,Citral treatment;ND,notdetected

表 4 柠檬醛对全株玉米青贮有氧暴露后发酵参数和微生物数量的影响

Table 4 Fermentation parameters and microbial counts of whole plant corn silage treated with citral after aerobic exposure

项目 Items	处理 Treatment	有氧暴露天数 Aerobic exposure days			SEM	P-value
		0 d	3 d	7 d		
干物质 Dry matter/(g·kg ⁻¹ FM)	CK	24.31 ^a	23.06 ^b	20.60 ^c	0.280	0.000
	C	—	22.64 ^b	20.86 ^c		
pH value	CK	3.89 ^d	5.79 ^b	7.02 ^a	0.237	0.000
	C	—	5.26 ^c	7.19 ^a		
乳酸菌 Lactic acid bacteria/(lg cfu·g ⁻¹ FM)	CK	6.83 ^c	9.01 ^b	9.29 ^a	0.172	0.000
	C	—	9.00 ^b	9.3 ^{ab}		
大肠杆菌 Coliform bacteria/(lg cfu·g ⁻¹ FM)	CK	<2	3.49 ^b	4.31 ^a	0.153	0.000
	C	—	2.6 ^c	3.68 ^b		
酵母菌 Yeasts/(lg cfu·g ⁻¹ FM)	CK	4.12 ^c	9.9 ^a	9.06 ^a	0.36	0.000
	C	—	8.62 ^b	8.75 ^b		
霉菌 Molds/(lg cfu·g ⁻¹ FM)	CK	<2	<2	7.74 ^a	0.049	0.019
	C	—	<2	7.52 ^b		

注:FM,鲜物质;cfu,菌落形成单位;SEM,标准误;CK,对照组;C,柠檬醛处理组;同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note:FM,fresh matter ;cfu,colony forming units;SEM,standard error of mean;CK,contro;C,Citral treatment

2.3 柠檬醛处理感染黄曲霉全株玉米青贮有氧暴露后微生物丰度变化

图 6 展示了有氧暴露以后常见有害菌(属水平)的变化情况。有氧暴露 3 d 后,CK 组中醋杆菌属(*Acetobacter*)为主要细菌,相对丰度为 80.69%,添加 0.4 mL·kg⁻¹ 柠檬醛处理组(61.98%)显著低于 CK 组($P<0.05$)。有氧暴露 7 d 以后,CK 组和柠檬醛处理组中醋杆菌属相对丰度无明显差异。有氧暴露 3 d

和 7 d 后,CK 组中 *Nakaseomyces* 属的相对丰度分别为 38.01% 和 30.87%,柠檬醛处理组中,*Nakaseomyces* 属的相对丰度分别为 23.25% 和 27.47%,与 CK 组相比,柠檬醛处理组显著降低了 *Nakaseomyces* 属的相对丰度($P<0.05$)。有氧暴露 3 d 后,柠檬醛处理组中的假丝酵母菌属(*Candida*,18.92%)显著低于 CK 组(23.68%)($P<0.05$)。柠檬醛处理组中哈萨克斯坦酵母属(*Kazachstania*)在第 3d 的相对丰度为 8.25%,

显著低于CK组(15.99%)($P<0.05$);有氧暴露7 d后,柠檬醛处理组中的哈萨克斯坦酵母属相对丰度为13.97%,显著高于CK组(5.05%)($P<0.05$)。有氧暴露3 d后,CK组中的伊萨酵母属(*Issatchenkia*)的相

对丰度为17.43%,显著高于柠檬醛处理组(6.72%)($P<0.05$)。有氧暴露7 d后,CK组中的优势菌种为曲霉属(*Aspergillus*,33.25%),显著高于柠檬醛处理组(4.32%)($P<0.05$)。

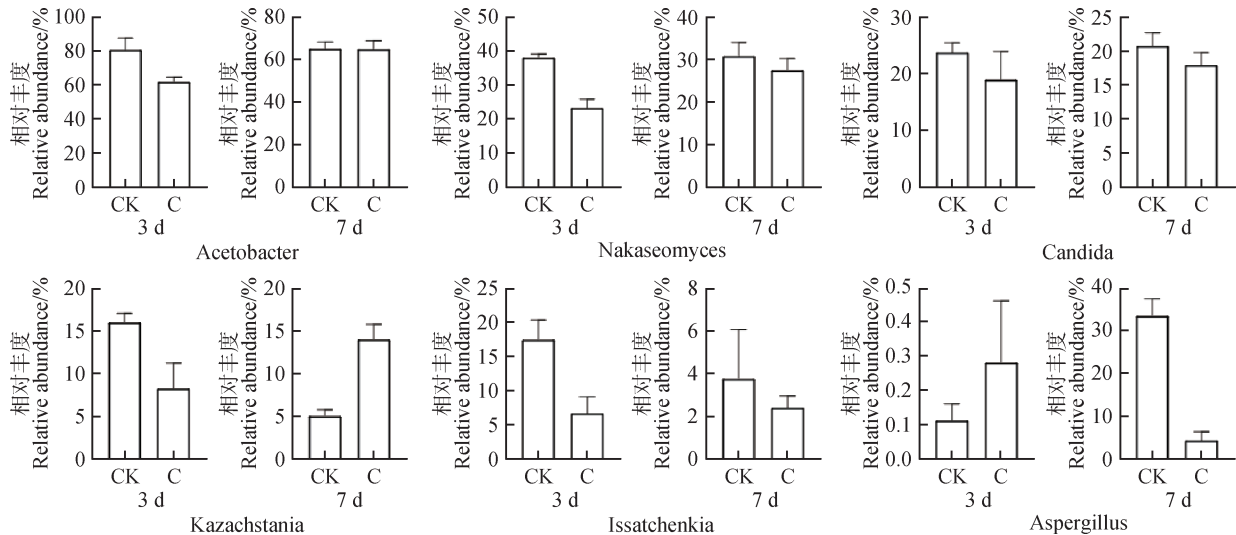


图6 柠檬醛对全株玉米有氧变败过程中几种微生物相对丰度的影响

Fig. 6 Effects of citral on relative abundance of several microbial communities in whole crop silage during exposure to air

注:CK,对照组;C,柠檬醛处理组

Note:CK,control;C,Citral treatment

3 讨论

3.1 柠檬醛抑制黄曲霉的生长

本研究中柠檬醛对黄曲霉的MIC为 $0.4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$,低于桔醛和茴香醛等其他化合物的单体^[18]。柠檬醛比这些化合物更容易获得,这表明柠檬醛在未来的应用中更有前景。此外,与一些常见的化学杀菌剂相比,柠檬醛具有可持续性强的效果稳定等优点。例如苯甲酸钠和山梨酸钾随着pH上升其抗菌效力减弱,当基质pH 5.5以上时,苯甲酸钠几乎无抗菌作用,山梨酸钾在基质pH 6.0以上时,抗菌效力也相当弱,而柠檬醛对霉菌的抗菌效力受基质pH影响较小,其抗菌活性pH范围较广,在3.5~7.5之间^[19]。柠檬醛对黄曲霉菌丝生物量的抑制作用通过菌丝干重来反映。随着柠檬醛浓度的增加,对应的菌丝干重减少,柠檬醛浓度与菌丝干重呈负相关,当浓度为 $0.2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制率为68.5%,浓度为 $0.4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制率为100%,优于庚醛和芳樟醇对菌丝生物量的完全抑制率的浓度0.8和 $1.2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^{[15][20]}。柠檬醛处理后的黄曲霉菌落直径发生了明显变化,随着柠檬醛浓度的增加,菌落直径逐渐减小,当浓度为 $0.0626 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,柠檬醛对黄曲霉的抑制效果明

显,抑制率为72.56%。这些结果表明,柠檬醛在气相中比液体里更能有效地抑制黄曲霉的生长,这可能是由于它在液体培养物中的扩散率和溶解度较低。

3.2 柠檬醛降低全株玉米青贮饲料中AFB1含量

由于饲料在饲喂过程中的残留和管理不善,青贮饲料很容易发生有氧变质^[21-22]。青贮饲料的有氧变质不仅会导致重要营养成分的大量损失,降低反刍动物的营养摄入和生产力,它还可能会增加霉菌和杆菌等不良微生物增殖的风险。这些活动总是导致青贮饲料中内毒素和霉菌毒素的积累,极大地威胁着动物的健康^{[5][23]}。AFB1是所有的黄曲霉毒素中污染范围最广泛、毒性最强的毒素。机体摄入AFB1后,毒素被细胞色素代谢为环氧化合物,环氧化合物毒性很高,具有很强的致畸和致癌特性^[24]。在我们的实验中,我们发现添加 $0.4 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的柠檬醛显著减少了全株玉米青贮饲料中黄曲霉的增殖和AFB1的合成。这可能是柠檬醛处理后黄曲霉毒素簇的大多数结构基因的表达下调,导致黄曲霉毒素生物合成减少^[25]。Xie等^[26]在开心果中使用月桂醛和香叶醇发现了类似的结果。这些结果表明,柠檬醛可以有效抑制黄曲霉在饲料中的生长和AFB1的合成。

3.3 柠檬醛降低全株玉米青贮饲料中有害菌的丰度

在有氧暴露期间,酵母被认为是需氧恶化的发起者,这些微生物消耗可溶性底物,包括可溶性糖和发酵酸,并提高青贮饲料的温度和pH值^[27-28]。Duniere等^[29]用酿酒酵母对全株玉米进行青贮处理,发现与对照组相比,酿酒酵母处理增加了酵母数量,加速了有氧恶化。本研究中,与CK组相比,添加柠檬醛很好的抑制了酵母菌和大肠杆菌的生长,降低了青贮饲料的pH。醋杆菌属的细菌可以利用氧气将乳酸转化成二氧化碳和水,导致pH升高,从而直接导致饲料有氧腐败^[30]。与CK组相比,柠檬醛处理组降低了醋酸杆菌属的相对丰度。*Nakaseomyces*和假丝酵母菌属是青贮有氧腐败中常见的酵母菌^[31-32],已有研究表明假丝酵母菌属是苜蓿青贮有氧腐败的启动菌,添加0.4 mL·kg⁻¹柠檬醛显著降低了*Nakaseomyces*和假丝酵母菌属的相对丰度。Wang等^[33]的研究表明,哈萨克斯坦酵母属(*Kazachstania*)相对丰度的升高是全株玉米青贮有氧变败的主要原因。本研究中,有氧暴露3 d后,与CK组相比,柠檬醛处理组显著降低了哈萨克斯坦酵母属的相对丰度。伊萨酵母属(*Issatchenkia*)真菌能够利用葡萄糖和果糖发酵生产乙醇,破坏有氧稳定性^[34],有氧暴露3 d后,CK组中伊萨酵母属显著高于柠檬醛处理组。此外,CK组中的曲霉属相对丰度显著高于柠檬醛组,这可能是由于有氧暴露7 d后CK组中大量黄曲霉增殖导致。这些相对丰度显著增加的菌可能是导致CK组中全株玉米青贮有氧腐败的重要原因。

4 结论

柠檬醛对黄曲霉的抑菌效果显著,可以有效抑制黄曲霉孢子萌发、菌丝生物量合成和菌落生长。在全株玉米青贮中添加0.4 mL·kg⁻¹的柠檬醛,可以有效控制有氧暴露过程中黄曲霉的增殖和AFB1的生物合成,降低饲料中的一些有害菌的相对丰度,为天然植物源抑菌剂的开发与应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] MITIKU A A, VANDEWEYER D, LIEVENS B, et al. Microbial profile during fermentation and aerobic stability of ensiled mixtures of maize stover and banana pseudostem in South Ethiopia[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(1):126-139
- [2] KROMMWEH M S, SCHMITHAUSEN A J, DEEKEN H F, et al. A new experimental setup for measuring greenhouse gas and volatile organic compound emissions of silage during the aerobic storage period in a special silage respiration chamber[J]. Environmental Pollution, 2020, 267:115513
- [3] 丁光省. 美国青贮玉米种植情况的调研报告[J]. 中国乳业, 2019(1):17-22
DING G S. Investigation report on silage corn planting in the United States[J]. China Dairy, 2019(1):17-22
- [4] WU S, HUANG P S, ZHANG C, et al. Novel strategy to understand the aerobic deterioration of corn silage and the influence of *Neolamarckia cadamba* essential oil by multi-omics analysis[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 482:148715 [LinkOut]
- [5] GROSS J J, MATEO P, RAMHOLD D, et al. Turnover of benzoxazinoids during the aerobic deterioration of maize silage (*Zea mays*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(5):2370-2376
- [6] PENG W X, MARCHAL J L M, VAN DER POEL A F B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing [J]. Animal Feed Science and Technology, 2018, 237:129-153
- [7] 田吉鹏. 全株玉米青贮饲料中黄曲霉毒素积累规律及调控技术研究[D]. 北京:中国农业大学, 2017:1-2
TIAN J P. The accumulation and control technology of aflatoxin in whole crop corn silage[D]. Beijing:China Agricultural University, 2017:1-2
- [8] 王旭哲. 紧实度及收获期对全株玉米青贮品质及霉菌毒素的影响研究[D]. 石河子:石河子大学, 2019:1-3
WANG X Z. Effect of compaction and harvest stage on quality and mycotoxin of whole-plant corn silage[D]. Shihezi:Shihezi University, 2019:1-3
- [9] 陈德奎, 郭香, 郑明扬, 等. 砂仁精油对紫花苜蓿青贮品质的影响[J]. 草地学报, 2021, 29(4):855-860
CHEN D K, GUO X, ZHENG M Y, et al. The effects of *Amomum villosum* Lour. essential oil on the fermentation quality of alfalfa[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(4):855-860
- [10] 周雨歆, 杨丹, 杨伟涛, 等. 黄梁木叶精油对柱花草和水稻秸秆发酵品质及细菌群落的影响[J]. 草地学报, 2024, 32(10):3326-3334
ZHOU Y X, YANG D, YANG W T, et al. Effect of *Neolamarckia cadamba* leaf essential oil on fermentation quality and bacterial community of stylo and rice straw silage [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(10):3326-3334
- [11] LIANG D D, XING F G, SELVARAJ J N, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, citral, and eugenol on aflatoxin biosynthetic gene expression and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(12):M2917-M2924
- [12] 艾淑娜, 陈琳元, 黄靖文, 等. 柠檬醛和丁香酚对黄曲霉生长的协同抑菌作用研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2023, 44(1):59-67
AI S N, CHEN L Y, HUANG J W, et al. Synergistic antifungal effect of citral and eugenol against the growth of *Aspergillus*

- flavus*[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2023, 44(1): 59-67
- [13] XU D, WEI M Q, PENG S R, et al. Cuminaldehyde in cumin essential oils prevents the growth and aflatoxin B1 biosynthesis of *Aspergillus flavus* in peanuts[J]. Food Control, 2021, 125: 107985
- [14] HU Y M, WANG Y R, ZHAO W B, et al. Efficacy of pterostilbene suppression on *Aspergillus flavus* growth, aflatoxin B1 biosynthesis and potential mechanisms[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 404: 110318
- [15] LI S F, ZHANG S B, LV Y Y, et al. Heptanal inhibits the growth of *Aspergillus flavus* through disturbance of plasma membrane integrity, mitochondrial function and antioxidant enzyme activity[J]. LWT, 2022, 154: 112655
- [16] 杨丹, 吴硕, 陈丹丹, 等. 黄梁木精油活性成分测定及其对全株玉米青贮有氧稳定的影响[J]. 草地学报, 2023, 31(9): 2860-2867
- YANG D, WU S, CHEN D D, et al. Determination of the active components of essential oil in *Neolamarckia cadamba* and its effect on the aerobic stabilization of whole plant corn silage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(9): 2860-2867
- [17] CHEN D D, ZHENG M Y, ZHOU Y X, et al. Improving the quality of Napier grass silage with pyroligneous acid: fermentation, aerobic stability, and microbial communities[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1034198
- [18] 谢一嘉, 李晓凤, 余以刚, 等. 茴香醛对黄曲霉菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 128-136
- XIE Y J, LI X F, YU Y G, et al. Inhibitory effect of p-anisaldehyde against *Aspergillus flavus* growth[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 128-136
- [19] 余伯良, 罗惠波, 周健, 等. 山苍子油抗霉菌及抑制黄曲霉产毒的有效成分研究[J]. 四川轻化工学院学报, 2002, 15(1): 32-36
- YU B L, LUO H B, ZHOU J, et al. Study on the active ingredient of antibiotic activities of *Litsea cubeba* oil on moulds and the effect on aflatoxin production[J]. Journal of Sichuan Institute of Light Industry and Chemical Technology, 2002, 15(1): 32-36
- [20] LI Y N, ZHANG S B, LV Y Y, et al. Linalool, the main volatile constituent from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp, prevents growth of *Aspergillus flavus* in post-harvest grains[J]. Food Control, 2022, 137: 108967
- [21] 张适, 常杰, 胡宗福, 等. 青贮饲料有害微生物及其抑制措施[J]. 动物营养学报, 2017, 29(12): 4308-4314
- ZHANG S, CHANG J, HU Z F, et al. Harmful microorganisms in silage and their suppression measures[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(12): 4308-4314
- [22] 韩战强, 宋艳画, 王志方. 影响青贮玉米品质因素的研究进展[J]. 饲料研究, 2020, 43(1): 106-109
- HAN Z Q, SONG Y H, WANG Z F. Research progress which influence factors about quality of silage corn [J]. Feed Research, 2020, 43(1): 106-109
- [23] OGUNADE I M, JIANG Y, KIM D H, et al. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(3): 1780-1794
- [24] 罗自生, 秦雨, 徐艳群, 等. 黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 250-257
- LUO Z S, QIN Y, XU Y Q, et al. Recent progress in the biosynthesis, metabolism and toxicity of aflatoxins[J]. Food Science, 2015, 36(3): 250-257
- [25] WANG P, MA L X, JIN J, et al. The anti-aflatoxigenic mechanism of cinnamaldehyde in *Aspergillus flavus* [J]. Scientific Reports, 2019, 9: 10499
- [26] XIE Y J, CAO Y F, ZHANG Y, et al. Synergistic antifungal properties of lauraldehyde and geraniol against *Aspergillus flavus* in pistachio[J]. Food Control, 2023, 153: 109915
- [27] 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[J]. 草业学报, 2022, 31(8): 157-166
- 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[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(8): 157-166
- [28] ZHANG X, DING Z T, USMAN S, et al. Metagenomics insights into the effects of lactic acid bacteria inoculation on the biological reduction of antibiotic resistance genes in alfalfa silage [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130329
- [29] DUNIERE L, JIN L, SMILEY B, et al. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage[J]. Journal of Animal Science, 2015, 93(5): 2322-2335
- [30] 李欣, 黄芳, 常旭, 等. 醋酸菌的营养特性分析及研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(15): 219-224
- LI X, HUANG F, CHANG X, et al. The status and analysis of the nutritional characteristics of acetic acid bacteria [J]. Food Research and Development, 2018, 39(15): 219-224
- [31] ZHAO C X, LIU J N, LI B Q, et al. Multiscale construction of bifunctional electrocatalysts for long-lifespan rechargeable zinc-air batteries[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(36): 2003619
- [32] 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
- [33] WANG C, SUN L, XU H W, et al. Microbial communities, metabolites, fermentation quality and aerobic stability of whole-plant corn silage collected from family farms in desert steppe of North China[J]. Processes, 2021, 9(5): 784
- [34] 王风芹, 汪媛媛, 陶西, 等. 耐高温东方伊萨酵母乙醇发酵特性[J]. 农业工程学报, 2014, 30(3): 180-187
- WANG F Q, WANG Y Y, TAO X, et al. Ethanol fermentation characteristics of thermotolerant *Issatchenkia Orientalis* [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(3): 180-187