

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.06.032

引用格式:孙楠,那亚,格根图,等.乳酸菌与纤维素酶对桑叶青贮品质及菌群的影响[J].草地学报,2026,34(6):2296—2305
SUN Nan, NA Ya, GE Gen-tu, et al. Effects of Adding Lactic Acid Bacteria and Cellulase on Fermentation Quality and Microbial Community of Mulberry Leaf Silage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(6):2296—2305

乳酸菌与纤维素酶对桑叶青贮品质及菌群的影响

孙楠¹, 那亚^{1*}, 格根图¹, 王志军¹, 姜熔¹, 孟根宝力尔², 尚浩一², 白红杰³

(1. 内蒙古农业大学草业学院/农业农村部饲草栽培、加工和高效利用重点实验室/草地资源教育部重点实验室, 内蒙古呼和浩特010011; 2. 克什克腾旗林业和草原局, 内蒙古赤峰025350; 3. 翁牛特旗农牧局, 内蒙古赤峰024500)

摘要:本研究旨在探究不同添加剂对桑(*Morus alba* L.)树叶青贮发酵特性及微生物群落的影响。试验以新鲜桑叶为原料,设置6个处理组[对照组(CK)、戊糖片球菌组(SSW)、植物乳杆菌组(SSZ)、纤维素酶组(SSX)、戊糖片球菌+纤维素酶组(SSWX)、植物乳杆菌+纤维素酶组(SSZX)],通过45天室温青贮,分析营养指标、发酵品质及微生物多样性。结果表明:在营养品质方面,SSZX组的粗蛋白含量最高(18.81% DM),同时其中性洗涤纤维与酸性洗涤纤维含量显著降低(分别为26.00% DM和22.00% DM)($P<0.05$)。在发酵特性方面,添加剂显著改善了发酵品质,其中SSZX组的pH值最低(4.29),乳酸含量最高(39.90 g·kg⁻¹),氨态氮含量最低(4.97 g·kg⁻¹),且未检测到丁酸。青贮微生物分析显示,CK组以肠杆菌属(40.00%)和镰孢菌属(20.00%)为主,存在腐败风险;而SSZ与SSZX组中植物乳杆菌为优势菌群(相对丰度为75.00%~84.00%)。此外,植物乳杆菌的相对丰度与pH值、中性洗涤纤维含量呈显著负相关,进一步证实其在抑制有害微生物方面的作用。综上所述,在桑树叶青贮中添加植物乳杆菌+纤维素酶的组合,青贮品质最佳。

关键词:青贮;桑树叶;乳酸菌添加剂;微生物多样性

中图分类号:S816.53

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)06-2296-10

Effects of Adding Lactic Acid Bacteria and Cellulase on Fermentation Quality and Microbial Community of Mulberry Leaf Silage

SUN Nan¹, NA Ya^{1*}, GE Gen-tu¹, WANG Zhi-jun¹, JIANG Rong¹, MENG Gen-bao-li-er²,
SHANG Hao-yi², BAI Hong-jie³

(1. College of Grassland Science, Inner Mongolia Agricultural University/Key Laboratory of Forage Cultivation, Processing and High Efficient Utilization, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Grassland Resources, Ministry of Education, Hohhot, Inner Mongolia 010011, China;

2. Keshiketeng Banner Forestry and Grassland Bureau, Chifeng, Inner Mongolia 025350, China; 3. Wengniuteqi Banner of Agriculture and Animal Husbandry, Chifeng, Inner Mongolia 024500, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of different additives on the fermentation characteristics and microbial community of mulberry leaf silage. In this experiment, fresh mulberry leaves were served as raw materials, and six treatment groups were established, including control group (CK), *Pediococcus pentosaceus* group (SSW), *Lactobacillus plantarum* group (SSZ), cellulase group (SSX), *Pediococcus pentosaceus*+cellulase group (SSWX), and *Lactobacillus plantarum*+cellulase group (SSZX). Nutritional indicators, fermentation quality, and microbial diversity were assessed during a 45-day silage process at room temperature. The results revealed that the SSZX group exhibited the highest crude protein content (18.81% DM) and significantly reduced levels of neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) (26.00% DM and 22.00% DM, respectively) ($P<0.05$). Regarding fermentation characteristics, the addi-

收稿日期:2025-06-05;修回日期:2025-08-17

基金项目:内蒙古农业大学草学一流学科科研专项 YLXKZX-NND-010;国家牧草产业技术体系资助(项目编号:CARS-34);内蒙古自治区重点研发与成果转化项目 2023YFDZ0004资助

作者简介:孙楠(2001-),男,汉族,内蒙古包头人,硕士研究生,主要从事牧草加工与利用方面的研究,E-mail:1624632482@qq.com;*通信作者 Author for correspondence, E-mail:naya_2003@126.com

tives markedly enhanced fermentation quality. The SSZX group recorded the lowest pH value (4.29), the highest lactic acid content ($39.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and the lowest ammonia nitrogen (AN) content ($4.97 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), without being detected butyric acid. In terms of microbial composition, the CK group was predominantly composed of *Enterobacter* (40.00%) and *Fusarium* (20.00%), indicating a risk of spoilage. In contrast, *Lactobacillus plantarum* was the dominant bacterium in the SSZ and SSZX groups, comprising 75.00% to 84.00% of the microbial population. The abundance of *Lactobacillus plantarum* was significantly negatively correlated with both pH and NDF, thereby confirming its inhibitory effect on harmful microorganisms. In conclusion, the addition of *Lactobacillus plantarum* and cellulase to mulberry leaf silage had the highest quality.

Key words: Silage; Mulberry leaves; Lactic acid bacteria additives; Microbial diversity

饲料资源的短缺与“人畜争粮”矛盾的日益突出,已成为制约我国畜牧业可持续发展的关键问题之一。在此背景下,开发非常规饲料资源显得尤为重要。我国《全国饲料工业“十三五”发展规划》明确将苧麻(*Boehmeria nivea*)、桑(*Morus alba* L.)叶等非粮作物列为亟待开发的饲料原料,旨在通过其工业化转化,构建更为高效、安全的饲料供应体系。

桑树作为原产于我国的多年生木本植物,拥有超过五千年的栽培历史,是我国传统蚕桑产业的基础。中国不仅是世界蚕桑文明的发源地,也是全球桑树种植面积最大的国家,种植面积常年稳定在约 $1 \times 10^4 \text{ km}^2$ 。桑树的生物量在众多木本叶用植物中位居前列,具有重要的生态与经济价值^[1-4]。桑树具有极强的生态适应性,作为深根性植物,它能够在 -40°C 至 40°C 的温度范围以及 pH 4.5 至 9.0 的广泛土壤条件下正常生长。这种突出的抗逆性使桑树在我国大部分地区均有分布^[3-4]。

营养学分析显示,桑叶是一种极具开发潜力的优质蛋白饲料资源。其鲜样水分含量通常在 61.74% 至 81.38% 之间。若以干物质为基础进行计算,桑叶的粗蛋白含量高达 13.44%~34.53%,粗脂肪含量在 2.08%~10.00% 之间,展现出良好的营养基础。同时,其中性洗涤纤维(Neutral detergent fiber, NDF)与酸性洗涤纤维(Acid detergent fiber, ADF)含量分别为 21.36%~34.76% 和 14.41%~24.18%,碳水化合物与灰分含量也颇为丰富^[5-9]。然而,桑枝叶作为饲料的应用面临两大挑战:其一,较高的粗纤维与抗营养因子(如单宁)含量,会抑制家畜的采食欲望,并降低日粮蛋白质的体内利用效率;其二,新鲜桑叶含水量高,在自然条件下晾晒干燥极易霉变,难以实现规模化、长期化的安全储存。

青贮技术被认为是解决桑叶储存难题并提升其饲用价值的有效策略。该技术通过乳酸菌主导的厌氧发酵,产生大量有机酸(主要是乳酸)从而快

速降低 pH 值,能最大限度地保存原料的营养成分,同时有效降解单宁等抗营养因子,显著改善饲料的适口性。此外,青贮过程还能抑制乃至消除有毒有害微生物的活动,延长饲料的保存期限,这对于调节饲草料的季节性供需平衡,尤其是在冬季为畜禽提供稳定的蛋白饲料来源具有重要意义^[10]。

在青贮添加剂领域,微生物制剂与酶制剂的应用是提升发酵品质的核心手段。其中,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)作为一种同型发酵乳酸菌,在高水分苜蓿青贮中已被证实能快速产酸,显著提升乳酸含量并降低 pH 值,从而优化整体发酵品质^[11]。另一项研究显示,戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)作为启动发酵的优良菌种,能够有效抑制青贮过程中蛋白质的过度分解,减少氨态氮的生成与营养损失^[12]。除微生物添加剂外,外源纤维素酶(Cellulase)也扮演着关键角色,它能将植物细胞壁中的纤维素和半纤维素分解为可被乳酸菌利用的单糖或寡糖,从而为发酵提供充足的底物,这一协同作用在整株玉米青贮中已得到验证^[13]。将乳酸菌与纤维素酶复合添加,有望在青贮初期形成协同效应,加速发酵进程,实现更优的保存与改良效果。

尽管桑叶作为饲料资源具有巨大潜力,但与传统青贮作物相比,国内外关于其青贮发酵特性及添加剂调控机制的系统性研究仍较为缺乏。现有报道多集中于营养成分分析,而对于如何通过外源添加剂定向调控发酵进程、塑造有益微生物群落并最终实现营养保存与抗营养因子降解的最大化,尚缺乏深入探讨。

因此,本研究立足于桑叶资源的高效饲料化利用,旨在通过单独或复合添加植物乳杆菌、戊糖片球菌及纤维素酶,系统研究这些添加剂对桑叶青贮过程中发酵参数(如 pH 值、乳酸、乙酸、氨态氮含量)、营养保存效果(粗蛋白、NDF/ADF 降解情况)及微生物群落动态的影响,深入揭示其改善桑叶青贮品质的内在作用机制,从而为开发高品质桑叶青贮饲料提供可靠的理论依据与实用的技术方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2024年7月10日在中国内蒙古自治区赤峰市克什克腾旗有机桑树园(117°58′55.07″, 43°13′20″N)采集桑树叶片,去除枝条,保留叶柄和叶片。添加剂:植物乳杆菌 2×10^{11} CFU $\cdot$ g $^{-1}$ (山东中科嘉亿生物工程有限公司,中国山东)、戊糖片球菌 2×10^{11} CFU $\cdot$ g $^{-1}$ (国药集团化学试剂有限公司,中国上海)、纤维素酶 2×10^{11} CFU $\cdot$ g $^{-1}$ (国药集团化学试剂有限公司,中国上海)。

1.2 试验设计

试验采用完全随机区组设计,设6个处理组:(1)对照组(CK,无添加);(2)戊糖片球菌组(SSW);(3)植物乳杆菌组(SSZ);(4)纤维素酶组(SSX);(5)戊糖片球菌+纤维素酶组(SSWX);(6)植物乳杆菌+纤维素酶组(SSZX)。每个处理3个重复。其中乳杆菌添加水平为 10^6 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ FW,纤维素酶添加水平50 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ FW。将新鲜采摘的桑叶用剪刀剪成1~2 cm,按试验设计量将各添加剂添加到桑树叶中,充分混合均匀后装于25 cm $\times$ 36 cm的聚乙烯袋内,总重200 g。抽真空封口后置于室温(20~30℃)保存。青贮后第45天打开青贮袋,分析青贮饲料各项指标。

1.3 试验方法

(1) 营养指标 将原料和青贮样品放置在105℃的烘箱内杀青15 min,再放置在65℃的烘箱内烘干48 h至恒重后粉碎。采用GB/T6435干燥法测定干物质(Dry matter, DM)的含量;采用凯氏定氮法^[14]测定粗蛋白质(Crude protein, CP)的含量;使用ANKOM(型号:A2000i)纤维分析仪测定ADF和NDF的含量;采用蒽酮-硫酸比色法^[15]测定可溶性碳水化合物(Water soluble carbohydrate, WSC)的含量。

(2) 发酵成份 准确称取10 g青贮样品,置于无菌容器中,加入90 mL蒸馏水。随后,将样品与蒸馏水的混合体系置于均质器上,以适宜力度轻拍2 min,促使样品充分分散。所得混合物经4层粗棉布初步过滤后,再通过滤纸进行二次过滤,从而获得液体提取物。所制备的滤液用于开展多项指标的测定。借助LEICI pH S-3C型pH计(上海益天

科学仪器有限公司,上海),对滤液的pH值进行测定。采用Waters e2695型高效液相色谱仪(美国马萨诸塞州米尔福德市)测定滤液中乳酸(Lactic acid, LA)、乙酸(Lactic acid, LA)、丙酸(Propionic acid, PA)以及丁酸(Butyric acid, BA)含量。参考Sun和Murphy在文献^[14-15]中提出的苯酚次氯酸比色法,对滤液中氨氮(NH₃-N)浓度进行测定。

(3) 微生物测序 本研究将桑树青贮45天后的样品,包括对照组(CK)及不同添加剂处理组(SSW, SSZ, SSX, SSWX, SSZX),委托北京百迈克生物科技有限公司进行微生物种群分析。使用TGuide S96磁珠法土壤/粪便基因组DNA提取试剂盒(制造商:天根生化技术(北京)有限公司;型号:DP812)提取原生草样品的微生物DNA。使用酶标仪(厂家:基因有限公司 GeneCompany Limited, 型号: Synergy HTX)对核酸进行浓度检测。扩增后的PCR产物使用浓度1.8%的琼脂糖凝胶进行电泳以检测其完整性。采用引物27F'(5'-AGRGT TTT-GATYNTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3')扩增细菌16S RNA基因的V3-V4高变区。PCR反应采用以下程序进行:95℃预变性2 min;然后进行25个循环,每个循环包括98℃变性10 s、55℃退火30 s、72℃延伸90 s;最后72℃终延伸2 min。对扩增产物进行浓度(Qubit)和条带(琼脂糖凝胶电泳)的检测,符合条件的样品进行混样。利用PacBio公司的SMRTbell Template Prep Kit对文库进行损伤修复、末端修复及接头连接,以制备SMRTbell环形测序模板,反应过程在PCR仪器上进行。最终使用AMPurePB磁珠纯化回收从而得到上机文库,使用PacBio Binding kit(Pacbio, USA)对上机文库进行上机前的结合,使文库结合上Primer(Pacbio, USA)及Polymerase(Pacbio, USA);将最终的反应产物进行AMPure PB Beads(Pacbio, USA)纯化后置于SequelII(Pacbio, USA)测序仪上进行上机测序,分析微生物多样性。

1.4 数据处理与统计

使用Microsoft Office Excel 2024对试验数据进行初步处理;使用百迈客云分析平台以及GraphPad Prism 9进行图片处理以及相关性热图绘制;使用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(ANOVA),结果以“平均值 $\pm$ 标准误”表示,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 青贮前桑树叶的营养成分

由表 1 可知,桑树叶青贮原料的 DM 为 37.63%FW,CP 为 17.06%DM,EE 为 11.78%DM, NDF 和 ADF 含量分别为 41.11%DM 和 32.93%DM, 可溶性碳水化合物为 1.46%DM。

2.2 添加剂对桑树叶青贮后营养成分的影响

由表 2 可知,DM 含量除 SSW 和 SSZW 外都显著低于 CK 组($P<0.05$)。各组 CP 含量均无显著差异,但 SSZX 组的 CP 含量最高。EE 含量在各组中

表 1 桑树叶青贮前原料特性

Table 1 Characteristics of raw mulberry leaf before silage

项目 Item	桑树叶 <i>Morus alba</i> L.
干物质 DM/%	37.63
粗蛋白 CP/(%DM)	17.06
粗脂肪 EE/(%DM)	11.78
中性洗涤纤维 NDF/(%DM)	41.11
酸性洗涤纤维 ADF/(%DM)	32.93
可溶性糖 WSC/(%DM)	1.46

也无显著差异。NDF 含量与 ADF 含量结果显示:CK 组的 NDF 含量显著高于 SSZX 组($P<0.05$);而 CK 组的 ADF 含量则显著高于 SSW 组与 SSX 组($P<0.05$)。

表 2 不同处理对青贮饲料营养成分的影响

Table 2 Effects of different treatments on nutritional components of silage

处理 Treatments	指标 Indicators				
	干物质 DM/%	粗蛋白 CP/(%DM)	粗脂肪 EE/(%DM)	中性洗涤纤维 NDF/(%DM)	酸性洗涤纤维 ADF/(%DM)
CK	35.52±0.00 ^a	18.49±0.05 ^a	10.45±0.00 ^a	31.11±0.02 ^a	26.26±0.02 ^a
SSW	34.60±0.00 ^a	18.65±0.32 ^a	9.83±0.01 ^a	29.31±0.00 ^{ab}	21.64±0.01 ^b
SSZ	30.86±0.01 ^b	18.62±0.03 ^a	10.99±0.00 ^a	28.76±0.00 ^{ab}	23.92±0.01 ^{ab}
SSX	30.74±0.01 ^b	18.55±0.03 ^a	11.62±0.00 ^a	28.90±0.00 ^{ab}	21.00±0.00 ^b
SSWX	31.45±0.01 ^b	18.66±0.16 ^a	9.81±0.00 ^a	27.83±0.02 ^{ab}	22.94±0.02 ^{ab}
SSZX	32.80±0.01 ^{ab}	18.81±0.03 ^a	9.86±0.01 ^a	26.32±0.01 ^b	22.20±0.01 ^{ab}

注:表中不同小写字母表示不同处理在 $P=0.05$ 水平上有显著差异,CK 为对照组,SSW 为戊糖片球菌组,SSZ 为植物乳杆菌组,SSX 为纤维素酶组,SSWX 为戊糖片球菌+纤维素酶组,SSZX 为植物乳杆菌+纤维素酶组。下同

Note: Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different treatments at the $P = 0.05$ level. CK represents control group, SSW represents pentosaceus group, SSZ represents *Lactobacillus plantarum* group, SSX represents cellulase group, SSWX represents pentosaceus + cellulase group, and SSZX represents *Lactobacillus plantarum*+cellulase group. The same as below

2.3 添加剂对桑树叶青贮后发酵品质的影响

不同处理对桑树叶青贮发酵品质的影响如表 3 所示,SSZ 和 SSZX 组的 pH 值显著低于 CK 组($P<0.05$)。CK 组的 AN 含量显著高于其他 5 组。各处理组的 LA 含量均高于 CK 组,其中 SSW 和 SSZ 组

的 LA 含量显著高于 CK 组($P<0.05$)。AA 含量在不同处理间存在显著差异($P<0.05$),其中 CK 组的 AA 含量显著低于其他各组。CK 组的 PA 含量显著高于 SSZ 组($P<0.05$)。在 6 组不同的处理中除 CK 外均未检测到 BA。

表 3 不同处理对青贮饲料发酵品质的影响

Table 3 Effects of different treatments on fermentation quality of silage

处理 Treatment	指标 Indicator					
	pH	氨态氮含量 AN/(g·kg ⁻¹)	乳酸 LA/(g·kg ⁻¹)	乙酸 AA/(g·kg ⁻¹)	丙酸 PA/(g·kg ⁻¹)	丁酸 BA/(g·kg ⁻¹)
CK	4.78±0.24 ^a	8.53±0.14 ^a	32.35±1.21 ^b	15.99±1.76 ^b	0.06±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a
SSW	4.56±0.03 ^{ab}	5.61±0.11 ^b	36.89±0.74 ^{ab}	19.23±0.17 ^a	0.03±0.01 ^{ab}	—
SSZ	4.38±0.03 ^b	5.13±0.02 ^b	36.60±0.70 ^{ab}	18.15±1.55 ^a	0.02±0.00 ^b	—
SSX	4.54±0.05 ^{ab}	5.10±0.05 ^b	37.75±1.64 ^{ab}	19.16±1.24 ^a	0.04±0.01 ^{ab}	—
SSWX	4.67±0.10 ^{ab}	5.13±0.02 ^b	39.39±0.75 ^a	19.34±0.90 ^a	0.04±0.01 ^{ab}	—
SSZX	4.29±0.07 ^b	4.97±0.03 ^b	39.90±2.10 ^a	19.00±0.17 ^a	0.03±0.01 ^{ab}	—

2.4 桑树叶青贮后的微生物多样性

2.4.1 桑树叶青贮后微生物的 α -多样性的影响

图 1 通过 Shannon 和 Simpson 指数评估处理间差异。ACE 指数与 Chao 1 指数在各处理组间均无显著差

异。然而, Simpson指数与 Shannon指数则表现出显著的组间差异。就 Simpson指数而言, CK组与 SSZ, SSX及 SSZX组无显著差异, 但CK组与其他处理组存在显著或极显著差异; SSW组除与 SSWX组无差异外, 与其他各组均存在显著或极显著差

异; 此外, SSWX组与 SSZX组间也有极显著差异 ($P<0.01$)。Shannon指数的组间差异模式与 Simpson指数相似, SSW组同样除与 SSWX组无差异外, 与其他各组均存在显著或极显著差异, 且 SSWX与 SSZX组间也存在显著差异 ($P<0.05$)。

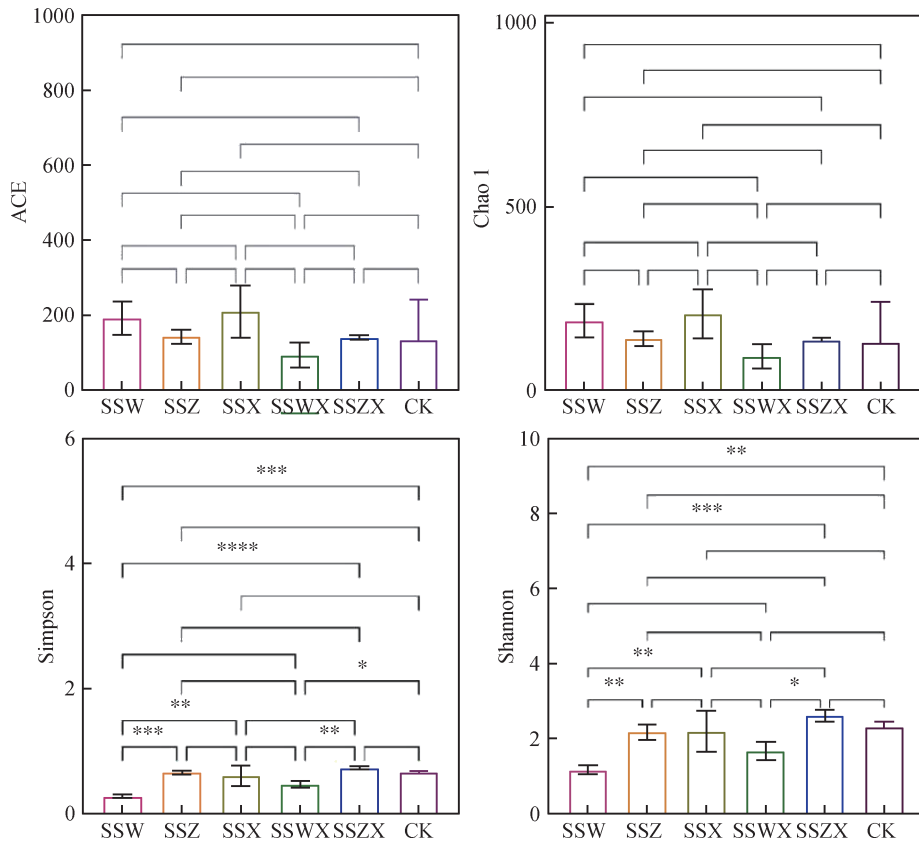


图1 桑树叶青贮后微生物 α -多样性分析

Fig. 1 Analysis of microbial α -diversity in mulberry leaf after silage

注: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$

Note: * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$

2.4.2 桑树叶青贮后微生物的 β -多样性的影响
采用主坐标分析(PCA)研究桑树叶青贮后微生物的 β 多样性, 由图2可知, SSZ和 SSZX的坐标轴以及 SSW, SSX和 SSWX的坐标轴间距离相近且与CK组明显分离。说明 SSZ和 SSZX以及 SSW, SSX和 SSWX之间的微生物群落的物种种类及丰度相似。

2.4.3 桑树叶青贮后组间微生物的相对丰度变化
由图3可知, 五个处理组厚壁菌门相对丰度均高于CK组, 而CK的变形杆菌门的相对丰度最高。在每个试验组中均检测出放线菌门。由图4可知, CK中检测出肠杆菌属的相对丰度最高, 约40%; 镰孢菌属与考萨考氏菌属的相对丰度次之, 都约为20%。片球菌属在 SSW, SSX, SSWX中的相对丰

度较高, 在 SSW中最高约82%。植物乳杆菌 SSZ与 SSZX的相对丰度最高(约84%, 75%)。由图5可知, CK中未检测出戊糖片球菌和植物乳杆菌, 以粪肠球菌为主, 占比为42%。在 SSW, SSX, SSWX处理组中戊糖片球菌属于优势菌种(约86%, 61%, 70%)。SSZ和 SSZX中植物乳杆菌属于优势菌种(约51%, 56%)。

2.4.4 桑树叶青贮后处理间微生物的 Venn图
根据97%相似度对抽平后的序列进行 OTU聚类分析(图6), CK, SSW, SSZ, SSX, SSWX, SSZX, 6组处理共得到2079个细菌 OTU, 6组处理中分别为309, 450, 322, 481, 306和194, 共有的细菌 OTU有17个, 占细菌 OTU总数的0.80%。其中 SSX的细菌 OTU总数最多, SSWX的细菌 OTU总数最少。

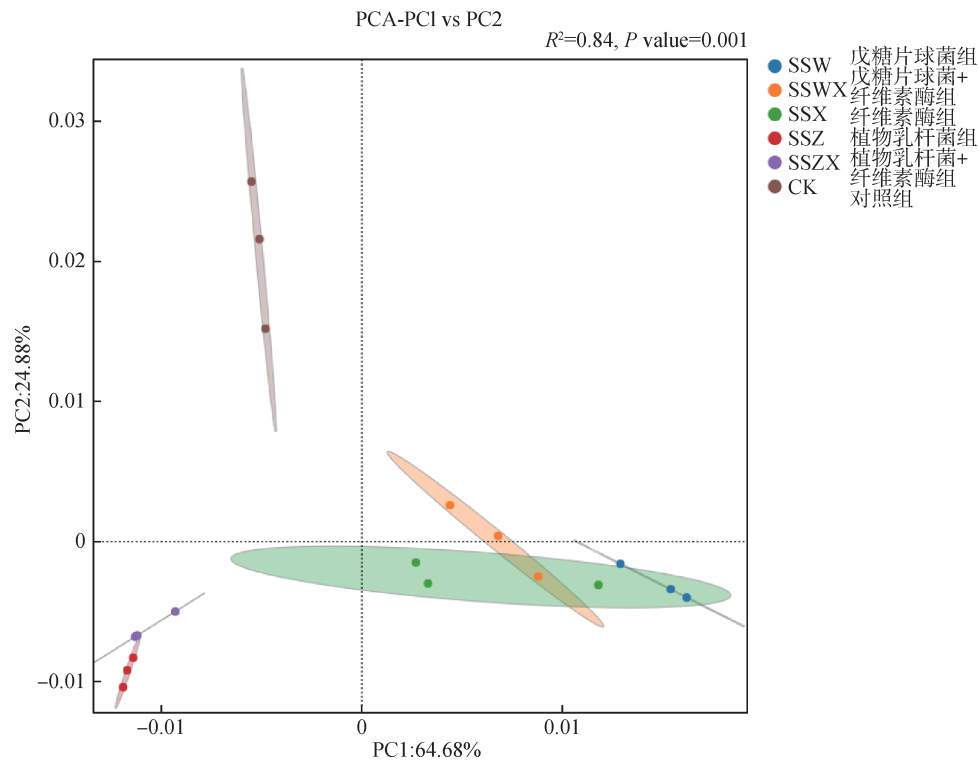


图 2 桑树叶青贮后微生物 PCA 分析图

Fig. 2 PCA analysis diagram of microorganisms after mulberry leaf silage

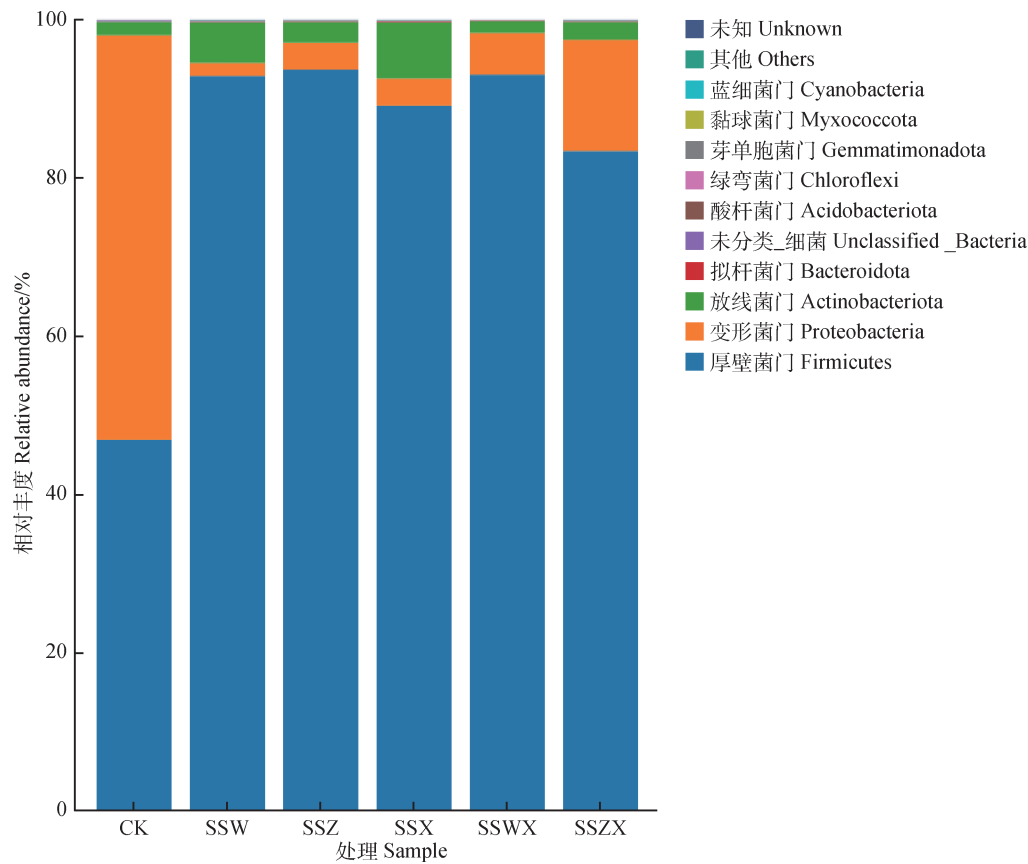


图 3 桑树叶青贮的物种丰度热图门水平

Fig. 3 Species abundance heatmap level of mulberry leaf silage

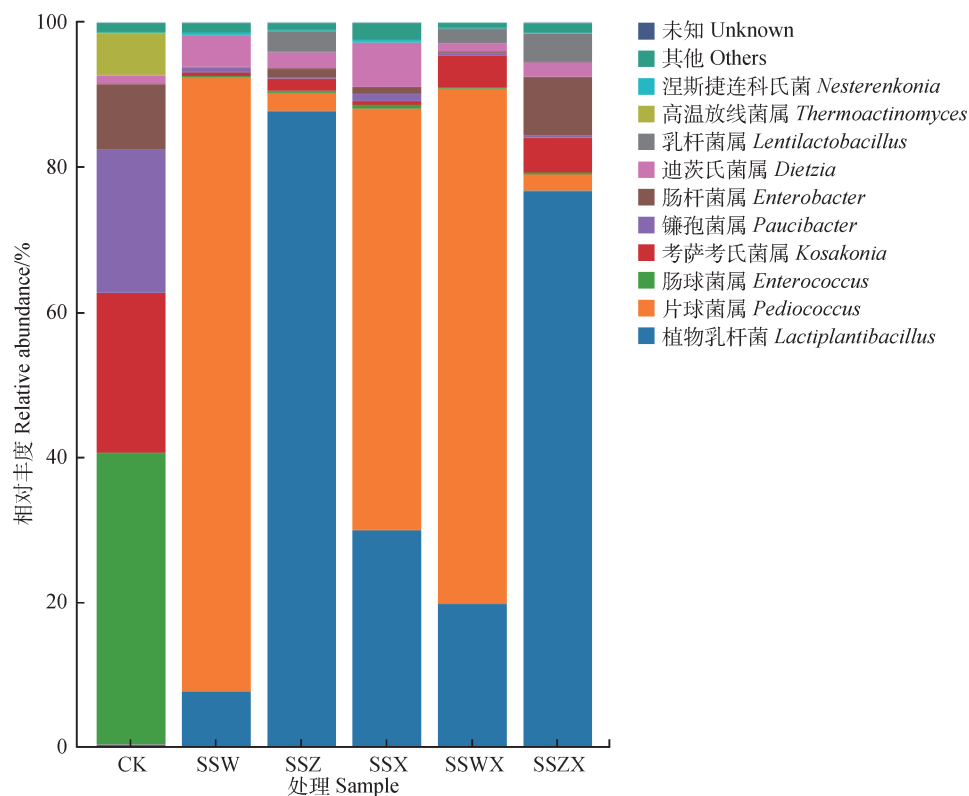


图 4 桑树叶青贮的物种丰度热图属水平

Fig. 4 Species abundance heatmap of mulberry leaf silage at genus level

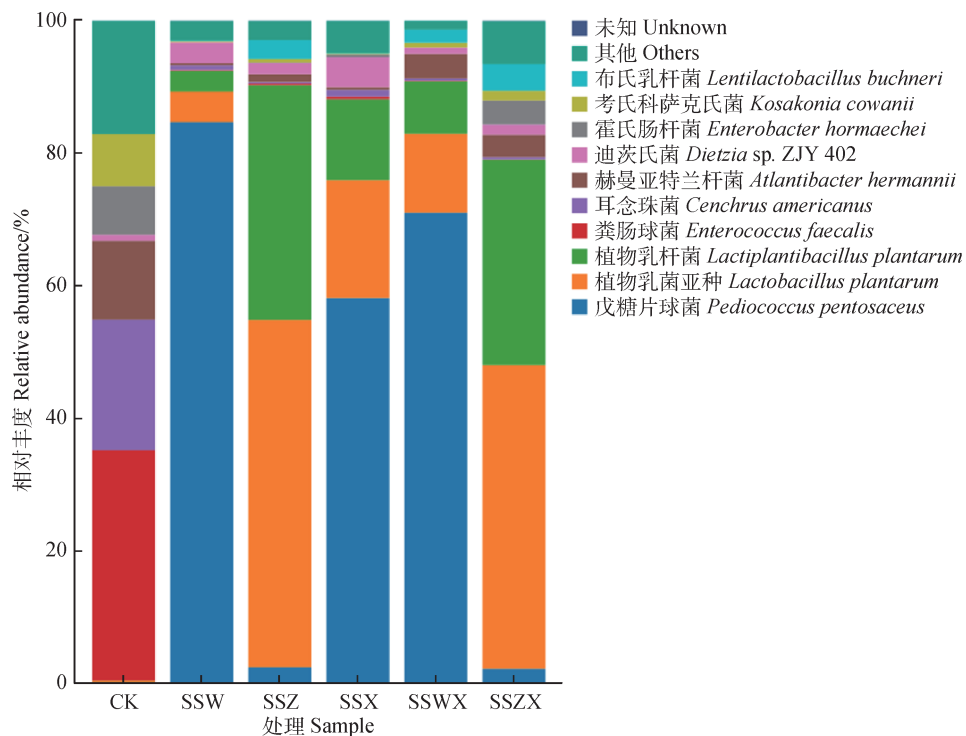


图 5 桑树叶青贮的物种丰度热图种水平

Fig. 5 Species abundance heat map of mulberry leaf silage at species level

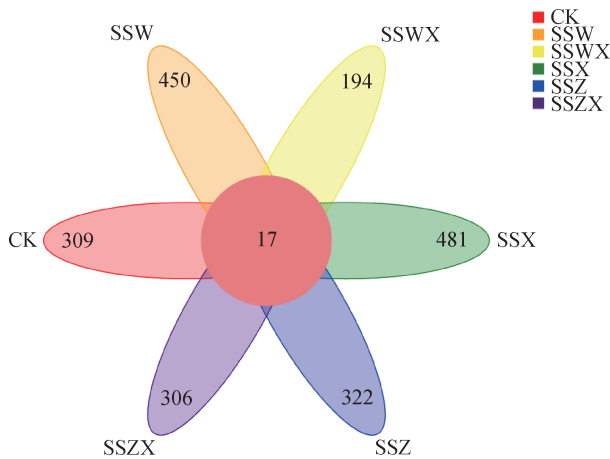


图6 桑树叶青贮中微生物 Venn 图

Fig. 6 The Venn diagram of microorganisms in mulberry leaf silage

2.4.5 桑树叶青贮后营养成分与微生物间的相关性 桑树叶青贮发酵微生物群落(属水平)与营养品质 pH, CP, EE, ADF, NDF 和 DM 之间的相关性热图见图 7。由图 7 可知, DM 含量与镰孢菌属相对丰度呈显著正相关关系, DM, pH 值, NDF 含量与植物乳杆菌属相对丰度呈显著负相关, DM 含量和 pH 值与乳杆菌属相对丰度呈显著负相关。

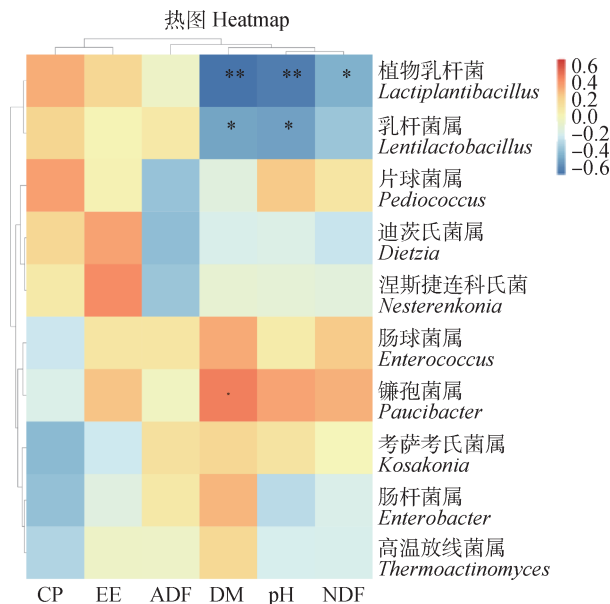


图7 桑树叶青贮中营养成分与微生物相关性热图

Fig. 7 Heatmap of correlation between nutrients and microorganisms in mulberry leaf silage

注:图7纵行代表丰度前10的微生物,横行代表不同环境因子。红色代表正相关关系,蓝色代表负相关关系,星号表示显著性

Note: Figure 7 shows the top 10 most abundant microorganisms in the vertical columns and different environmental factors in the horizontal rows. Red indicates a positive correlation, blue indicates a negative correlation, and asterisks denote significance

3 讨论

3.1 添加剂对桑树叶青贮后营养品质和发酵成分的影响

乳酸菌在青贮发酵过程中具有重要作用,而不同的乳酸菌对青贮品质也有着不同的作用。饲料的营养成分是评价饲料品质的关键性指标,测定营养成分的含量能够对营养品质形成初步的评价,而 DM 的含量是反映饲料营养价值的重要指标之一^[16]。在青贮过程中,各处理组除 CK 外,DM 含量均显著下降,该结果与牛琼梅等^[17]的研究结果一致。该结果可能是由于青贮前期,有氧环境中的好氧微生物将 CP 分解并且同时也消耗大量的营养物质,导致 DM 含量的下降。该试验中添加的乳酸菌和酶的含量显著高于 CK 组,可能是由于乳酸菌促进乳酸发酵,同时抑制腐败的有害微生物的发育,也降低了蛋白质和氨基酸的降解,6 个处理中添加纤维素酶(SSX)的 CP 含量最低,添加植物乳杆菌+纤维素酶(SSZX)的 CP 含量最高。

NDF 与 ADF 能反映饲料的纤维含量,纤维素的含量影响动物的消化率和采食率^[18]。桑树叶原料中的 NDF 和 ADF 含量比较高,在青贮之后 NDF 与 ADF 的含量均明显下降,与 CK 组相比,添加乳酸菌和酶的组均降低了 ADF 和 NDF 的含量。有些研究表明,在青贮过程中添加乳酸菌和纤维素酶能够降低青贮饲料中的纤维含量,这一结果与本研究相一致^[18-19]。而在乳酸菌的发酵过程中利用了纤维素导致其含量降低,并且纤维素酶的添加导致其细胞壁的分解,胞内物质露出,导致饲料的纤维含量降低并转化为发酵底物^[20-21]。

不同处理组对青贮饲料的 pH 值、AN, LA, AA 和 PA 含量均有显著影响。pH 值作为评价青贮饲料品质的重要指标之一,当 pH 值较低时能够抑制有害微生物的发育和繁殖,当 pH 值小于 4.5 时说明青贮的发酵品质较好^[22]。较低的 pH 值和 AN 含量分别意味着更强的抑菌能力以及更少的 CP 分解^[23]。本研究中 CK 组的 pH 值均高于其他 5 组,且 SSZ 和 SSZX 组的 pH 值小于 4.5。在氨态氮(AN)含量方面,CK 组显著高于各处理组,其中以 SSZX 组的含量最低。各添加剂处理均显著提升了乳酸(LA)的积累量,且 SSZX 组的 LA 含量在所有处理中最高。同时,各处理组也显著降低了乙酸(AA)

与丙酸(PA)的含量。说明外源纤维素酶将桑叶中的纤维素分解为可发酵糖,为植物乳杆菌提供了充足的发酵底物,从而促进了同型乳酸发酵,表现为LA产量最高。旺盛的乳酸发酵快速降低了青贮体系的pH值,有效抑制了梭菌等有害微生物的活动,因此显著降低了蛋白质分解产物AN以及AA,PA等次级发酵产物的生成,最大程度地保存了饲料营养并优化了发酵品质,这一结果与魏晓斌、郑明扬等的研究结果相一致^[24-25]。试验中除CK组外均未检测出BA,表明添加乳酸菌以及纤维素酶能够抑制梭菌的繁殖,提高青贮的品质,这与李荣荣等^[26]和鄢炳森等^[27]的研究结果一致。

3.2 桑树叶青贮后的微生物多样性变化

在门水平下,发现CK组的厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度要显著低于添加乳酸菌和纤维素酶的试验组,这与以往象草(*Pennisetum purpureum* Schumacher)青贮的研究结果一致^[28]。厚壁菌门主要包括支原体、非产芽孢和产芽孢菌群,可降解如蛋白质、淀粉、纤维素等大分子物质^[29]。本研究表明,桑树叶青贮时添加戊糖片球菌(SSW)、植物乳杆菌(SSZ)、纤维素酶(SSX)或其组合(SSWX,SSZX),均能有效重塑微生物群落结构,具体表现为厚壁菌门丰度显著上升,而变形菌门丰度显著下降。值得注意的是,作为青贮关键功能菌群的乳酸菌,其主要的分类地位即为厚壁菌门,说明试验组中的益生菌含量高从而抑制了有害微生物的发育和繁殖。并且CK组的变形菌门占比高,变形菌门包括如大肠杆菌、沙门氏菌等大部分的病原菌^[30],说明自然青贮会导致病原微生物的增加与乳酸菌竞争发酵底物,从而导致AN含量和pH值升高,CP含量下降。

在属水平下,CK组几乎未检测到植物乳杆菌属,并且检测出镰孢菌属和肠杆菌属,说明桑树叶自然发酵下未能成功抑制腐败菌,这与在全株玉米(*Zea mays*)和花生(*Arachis hypogaea*)混合青贮中的研究结果一致^[31]。而SSZ和SSZX的优势菌属为植物乳杆菌,SSW,SSX和SSWX的优势菌为片球菌,且其他有害菌相对丰度降低,这说明乳酸菌和纤维素酶的混合使用对不良微生物的抑制效果更强^[32]。说明添加植物乳杆菌+纤维素酶后,青贮中产酸能力增强,pH值降低,植物乳杆菌的增强也会抑制有害微生物的繁殖^[33]。

4 结论

桑树叶单独青贮不易成功,乳酸菌丰度低,腐败菌未得到抑制。戊糖片球菌、植物乳杆菌、纤维素酶等添加剂均能改善桑树叶青贮的品质。而植物乳杆菌+纤维素酶(SSZX)的组合增加了青贮有益微生物的丰度,提高了青贮饲料的品质。综合分析,在桑树叶青贮中添加植物乳杆菌+纤维素酶的青贮品质最佳,可在桑树叶的青贮中使用。

参考文献

- [1] 姚芳,倪吾钟,杨肖娥. 桑树的种质资源、生态适应性及其应用前景[J]. 科技通报,2004,20(4):289-292,297
YAO F, NI W Z, YANG X E. Genotype resources and ecological adaptation of mulberry plants (*Morus indica* L.) and their application foreground[J]. Bulletin of Science and Technology, 2004, 20(4): 289-292, 297
- [2] 杜周和,刘俊凤,左艳春,等. 桑叶的营养特性及其饲料开发利用价值[J]. 草业学报,2011,20(5):192-200
DU Z H, LIU J F, ZUO Y C, et al. The nutrient components and utilization of mulberry as animal forage[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(5): 192-200
- [3] 吴浩,孟庆翔. 桑叶的营养价值及其在畜禽饲养中的应用[J]. 中国饲料,2010(13):38-40,43
WU H, MENG Q X. The nutritive value of mulberry leaves and their application in livestock feeding[J]. China Feed, 2010 (13): 38-40, 43
- [4] 邓文,叶楚华. 桑叶用作家畜饲料研究进展[J]. 北方蚕业, 2011, 32(3): 7-10
DENG W, YE C H. The research progress of mulberry leaves as feed of livestock[J]. North Sericulture, 2011, 32(3): 7-10
- [5] 周婵,吕金凤,曾秀,等. 重庆地区15种饲料用桑树不同生长期粗蛋白含量的动态分析[J]. 畜牧与饲料科学,2018,39(6):32-35
ZHOU C, LÜ J F, ZENG X, et al. Dynamic analysis of crude protein content of 15 kinds of forage mulberry in different growth stages in Chongqing [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2018, 39(6): 32-35
- [6] 王雯熙,杨红建,薄玉琨,等. 不同品种桑叶营养成分分析与代谢能值评定研究[J]. 中国畜牧杂志,2012,48(3):41-45
WANG W X, YANG H J, BO Y K, et al. Study on nutritional composition analysis and metabolic energy evaluation of different varieties of mulberry leaves[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2012, 48(3): 41-45
- [7] 俞燕芳,黄金枝,石旭平,等. 我国桑叶食品开发研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(7):1572-1578
YU Y F, HUANG J Z, SHI X P, et al. Research progress in food development of mulberry leaves in China[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(7): 1572-1578
- [8] 罗玛卓,李冰,朱宇旌. 桑叶在动物生产中的不同利用方式研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2021,57(7):27-31
LUO Y Z, LI B, ZHU Y J. Research progress on different utilization ways of mulberry leaf in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(7): 27-31
- [9] 郑莎,曾卫湘,韩冷,等. 45个桑种质和品种资源叶的营养品质综合评价[J]. 食品科学,2017,38(8):159-163
ZHENG S, ZENG W X, HAN L, et al. Comprehensive evaluation of nutritional quality of leaves from 45 mulberry germ-plasms and varieties[J]. Food Science, 2017, 38(8): 159-163

- [10] FILYA I, MUCK R E, CONTRERAS-GOVEA F E. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11):5108-5114
- [11] YANG F Y, WANG Y P, ZHAO S S, et al. *Lactobacillus plantarum* inoculants delay spoilage of high moisture alfalfa silages by regulating bacterial community composition [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:1989
- [12] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Scientific opinion on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* (NCIMB 30238) and *Pediococcus pentosaceus* (NCIMB 30237) as silage additives[J]. EFSA Journal, 2014, 12(9):3829
- [13] HU Z F, NIU H X, TONG Q, et al. The microbiota dynamics of alfalfa silage during ensiling and after air exposure, and the metabolomics after air exposure are affected by *Lactobacillus casei* and cellulase addition [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:519121
- [14] SUN L, NA N, LI X M, et al. Impact of packing density on the bacterial community, fermentation, and in vitro digestibility of whole-crop barley silage[J]. Agriculture, 2021, 11(7):672
- [15] MURPHY R P. A method for the extraction of plant samples and the determination of total soluble carbohydrates[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1958, 9(11):714-717
- [16] 陈鑫珠, 邹长连, 张文昌, 等. 纤维素酶对常规水分和低水分稻草青贮品质的影响[J]. 草地学报, 2018, 26(2):453-458
- CHEN X Z, ZOU C L, ZHANG W C, et al. The effects of cellulase on silage quality of rice straw with normal and low moisture contents[J]. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(2):453-458
- [17] 牛琼梅, 初晓辉, 李彦飞, 等. 不同种类添加剂对全株玉米发酵特性及营养品质的影响[J]. 饲料研究, 2024, 47(1):93-98
- NIU Q M, CHU X H, LI Y F, et al. Effect of different additives on fermentation characteristics and nutritional quality of whole plant corn[J]. Feed Research, 2024, 47(1):93-98
- [18] 陈凌华, 杨志坚, 程祖铎. 添加酶制剂和乳酸菌对水稻秸秆青贮质量的影响[J]. 中国饲料, 2018(20):81-85
- CHEN L H, YANG Z J, CHENG Z X. Effects of enzyme preparation and lactic acid bacteria on the fermentation quality of rice straw silage[J]. China Feed, 2018(20):81-85
- [19] 李乔仙, 张美艳, 薛世明, 等. 全株大麦拉伸膜裹包青贮营养成分及发酵品质动态变化研究[J]. 家畜生态学报, 2021, 42(1):46-51
- LI Q X, ZHANG M Y, XUE S M, et al. Dynamic variation of nutrients and silage quality of barley wrapped with stretched film during storage period [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2021, 42(1):46-51
- [20] 王洋, 姚权, 孙娟娟, 等. 乳酸菌添加剂对苜蓿青贮品质和黄酮含量的影响[J]. 中国草地学报, 2018, 40(2):48-53
- WANG Y, YAO Q, SUN J J, et al. Effects of additives of lactic acid bacteria on alfalfa silage quality and flavonoids content[J]. Chinese Journal of Grassland, 2018, 40(2):48-53
- [21] 万江春, 于辉, 张延辉, 等. 纤维素酶及乳酸菌对棉花秸秆青贮饲料发酵品质及体外消化率的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(4):101-106
- WAN J C, YU H, ZHANG Y H, et al. Effects of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and *in vitro* digestibility of cotton straw silage [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2019, 55(4):101-106
- [22] 刘海燕, 王彦靖, 王秀飞, 等. 不同品种菊芋秸秆黄贮饲料的饲用价值评价[J]. 动物营养学报, 2019, 31(11):5321-5328
- LIU H Y, WANG Y J, WANG X F, et al. Evaluation of feeding value of different varieties of Jerusalem artichoke straw silage feed [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(11):5321-5328
- [23] 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
- [24] 郑明扬, 吴硕, 郭香, 等. 添加乳酸菌和纤维素酶对砂仁叶青贮品质的影响[J]. 草地学报, 2021, 29(5):1113-1117
- ZHENG M Y, WU S, GUO X, et al. Effects of *Lactobacillus* and cellulase on the silage quality of *Amomum villosum* leaves [J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(5):1113-1117
- [25] 魏晓斌, 殷国梅, 薛艳林, 等. 添加乳酸菌和纤维素酶对紫花苜蓿青贮品质的影响[J]. 中国草地学报, 2019, 41(6):86-90
- WEI X B, YIN G M, XUE Y L, et al. Effects of adding lactic acid bacteria and cellulase on silage quality of *Medicago sativa* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2019, 41(6):86-90
- [26] 李荣荣, 郑猛虎, 崔欣雨, 等. 优良乳酸菌的筛选及对苜蓿青贮发酵品质的影响[J]. 中国草地学报, 2021, 43(11):69-75, 104
- LI R R, ZHENG M H, CUI X Y, et al. Screening of lactic acid bacteria and its effect on fermentation characteristics of alfalfa silage [J]. Chinese Journal of Grassland, 2021, 43(11):69-75, 104
- [27] 郭炳森, 刘玉珊, 刘凌霄, 等. 乳酸菌与纤维素酶对丹参地上部分青贮品质的影响[J]. 草地学报, 2024, 32(10):3313-3319
- FENG B S, LIU Y S, LIU L X, et al. Effects of lactic acid bacteria and cellulase on the silage quality of above-ground parts of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(10):3313-3319
- [28] 武齐丰, 陈晨, 黄沁骄, 等. 纤维素酶和乳酸菌对杂交象草青贮结构性碳水化合物影响[J]. 草地学报, 2024, 32(7):2314-2322
- WU Q F, CHEN C, HUANG Q J, et al. A effects of cellulase and high-temperature tolerant lactic acid bacteria on structural carbohydrate of (*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*) × *P. purpureum* schum [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(7):2314-2322
- [29] 杨文琦, 龙宣杞, 崔卫东. 玉米青贮中细菌多样性分析[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(8):1424-1433
- YANG W Q, LONG X Q, CUI W D. Bacteria diversity analysis in corn silage [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2013, 50(8):1424-1433
- [30] 陶莲, 刁其玉. 利用MiSeq高通量测序技术分析风干处理及青贮发酵对玉米秸秆菌群构成及丰度的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(S1):94-103
- TAO L, DIAO Q Y. MiSeq high-throughput sequencing technique was used to analyze the effects of air drying and silage fermentation on the composition and abundance of corn straw flora [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(S1):94-103
- [31] WANG Q D, WANG R X, WANG C Y, et al. Effects of cellulase and *Lactobacillus plantarum* on fermentation quality, chemical composition, and microbial community of mixed silage of whole-plant corn and peanut vines [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(6):2465-2480
- [32] 王诚, 刘雨, 翟桂玉, 等. 复合乳酸菌对杂交构树和饲料桑青贮发酵品质的影响[J]. 山东畜牧兽医, 2022, 43(3):15-19
- WANG C, LIU Y, ZHAI G Y, et al. Effects of compound lactic acid bacteria on fermentation quality of hybrid *Broussonetia papyrifera* and forage mulberry silages [J]. Shandong animal husbandry veterinarian, 2022, 43(3):15-19
- [33] 舒刚钦, 王慧, 张琛, 等. 构树源乳酸菌影响其青贮发酵品质[J]. 草业科学, 2023, 40(12):3210-3221
- SHU G Q, WANG H, ZHANG C, et al. Lactic acid bacteria from *Broussonetia papyrifera* affect its silage fermentation quality [J]. Pratacultural Science, 2023, 40(12):3210-3221