

# 冻融对燕麦青贮有氧暴露阶段细菌和真菌演替的影响

李海萍<sup>1,2</sup>, 贾志锋<sup>3</sup>, 刘文辉<sup>3</sup>, 马祥<sup>3</sup>, 周青平<sup>2</sup>, 关皓<sup>2\*</sup>

1 青海师范大学 生命科学学院, 青海 西宁

2 西南民族大学, 四川若尔盖高寒湿地生态系统国家野外科学观测研究站, 四川 成都

3 青海大学, 青海省青藏高原优良牧草种质资源利用重点实验室, 青海 西宁

李海萍, 贾志锋, 刘文辉, 马祥, 周青平, 关皓. 冻融对燕麦青贮有氧暴露阶段细菌和真菌演替的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1301-1318.

LI Haiping, JIA Zhifeng, LIU Wenhui, MA Xiang, ZHOU Qingping, GUAN Hao. Effects of freeze-thaw on bacterial and fungal succession during aerobic exposure stage of oat silage[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1301-1318.

**摘要:**【目的】为探索冻融条件对燕麦青贮在有氧暴露阶段的影响。【方法】将燕麦在冻融条件(20 °C和-5 °C每 12 h 交替 1 次, S 组)下青贮 60 d 后进行有氧暴露监测, 并以恒温 20 °C (20 组)作为对照。分别在青贮 60 d 和有氧暴露 1、3、5 d 取样进行发酵品质和营养品质的测定, 同时进行 16S rRNA 基因和 ITS 测序。【结果】随着有氧暴露时间的延长 pH 值升高。与原冻融温度下的有氧暴露相比, 室温下的有氧暴露导致 pH 值和氨态氮含量上升更快, 乳酸和乙酸含量下降也更快。S 组, 特别是室温下的有氧暴露条件下, 丙酸和丁酸的生成速度更快。随着有氧暴露的推进, 肠杆菌和酵母菌数量不断增加, 而乳酸菌数量不断减少( $P<0.05$ )。细菌的 Shannon 指数和 Simpson 指数随着有氧暴露时间的延长而增加, 乳酸菌的丰度不断降低。有氧暴露第 3 天时, 细菌群落结构出现明显差异。与原温度下的有氧暴露相比, 室温下的有氧暴露加速了微生物的更替。S 组中指征腐败的酵母菌和霉菌的种类及数量更多。【结论】冻融条件加速了燕麦青贮在有氧暴露阶段的变败过程, 尤其是在室温下进行有氧暴露时。本研究为高寒区燕麦青贮的高品质调制及存放提供理论指导。

**关键词:** 青贮; 冻融; 有氧稳定性; 燕麦

资助项目: 国家自然科学基金(32460360); 青海省基础 Research 计划自然科学基金(2024-ZJ-978)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32460360) and the Natural Science Foundation Project of Qinghai Provincial Basic Research Program (2024-ZJ-978).

\*Corresponding author. E-mail: [guanh0427@outlook.com](mailto:guanh0427@outlook.com)

Received: 2024-08-23; Accepted: 2024-12-18; Published online: 2025-02-14

## Effects of freeze-thaw on bacterial and fungal succession during aerobic exposure stage of oat silage

LI Haiping<sup>1,2</sup>, JIA Zhifeng<sup>3</sup>, LIU Wenhui<sup>3</sup>, MA Xiang<sup>3</sup>, ZHOU Qingping<sup>2</sup>, GUAN Hao<sup>2\*</sup>

1 School of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai, China

2 Sichuan Zoige Alpine Wetland Ecosystem National Observation and Research Station, Southwest Minzu University, Chengdu, Sichuan, China

3 Key Laboratory of Superior Forage Germplasm in the Qinghai-Xizang Plateau, Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

**Abstract:** [Objective] To explore the effects of freeze-thaw on oat silage during the aerobic exposure stage. [Methods] Oat silage was stored at a constant temperature (20 °C, group 20, control) and freeze-thaw conditions (20 °C and -5 °C alternating every 12 h, group S) for 60 days and then subjected to aerobic exposure. Samples were collected on day 60 of ensiling and after aerobic exposure for 1, 3, and 5 days, respectively, for the determination of fermentation quality and nutritional quality as well as for 16S rRNA gene and ITS sequencing. [Results] The pH rose as the aerobic exposure was prolonged. The samples subjected to aerobic exposure at room temperature showed more rapid increases in ammonia nitrogen content and pH and more rapid decreases in lactic acid and acetic acid content than those subjected to aerobic exposure at freeze-thaw temperatures. Propionic acid and butyric acid were produced more rapidly in the S group, especially in the case of aerobic exposure at room temperature. Enterobacteria and yeast increased while lactic acid bacteria decreased as the aerobic exposure was prolonged ( $P < 0.05$ ). Shannon and Simpson indices of bacteria increased during aerobic exposure, and the relative abundance of lactic acid bacteria kept decreasing. The bacterial community structure presented a significant difference on days 3 of aerobic exposure, and microbial succession was accelerated by aerobic exposure at room temperature compared with that at the freeze-thaw temperature, with more species and higher counts of yeast and molds indicative of spoilage in the S group. [Conclusion] Freeze-thaw accelerated aerobic deterioration, especially aerobic exposure at room temperature. This study provides theoretical guidance for high-quality modulation and storage of oat silage in alpine areas.

**Keywords:** silage; freeze-thaw; aerobic stability; oat

发酵后的出料标志着青贮过程的结束。除了良好的发酵品质，有氧稳定性也是确保饲喂效果的关键因素。通过研究冻融对燕麦青贮发酵过程的影响，发现冻融不仅作用于发酵阶段的青贮品质，而且在开窖后对青贮的有氧稳定性也起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。在青贮发酵过程中，产生的乳酸为微生物提供了生长所需的底

物，因此，当青贮窖(或青贮包)被打开时，发酵好的青贮料再次与氧气接触<sup>[2]</sup>，导致一些好氧腐败微生物(如酵母等)变得活跃并大量繁殖<sup>[3]</sup>，从而引发二次发酵。这不仅会造成干物质的大量损失<sup>[4]</sup>和营养物质的严重流失<sup>[5]</sup>，还会导致青贮料温度升高，进一步加剧青贮变质。此外，有氧腐败还会增加潜在致病性微生物或其他不良

微生物(如霉菌、肠杆菌和单核增生李斯特菌)的增殖风险,对青贮饲料的卫生质量造成严重的负面影响<sup>[6]</sup>,进而影响饲喂效果。

冻融研究是发酵过程研究的重要组成部分。冻融引发的应激是一个复杂的过程,可能包括脱水作用、物理应激、低温应激和氧化应激等<sup>[7]</sup>。对土壤微生物的冻融影响研究发现,冻融不会导致土壤微生物  $\alpha$  多样性的减少,但会显著影响微生物的生物量和群落结构,导致微生物 C 和 N 代谢功能下降<sup>[8]</sup>。Dong 等<sup>[9]</sup>通过研究红三叶经受冻融后再进行青贮的情况,发现原料的冻融促进了青贮微生物区系中乳酸菌的生长,降低了发酵期间泛菌和肠杆菌的相对丰度,对发酵品质有一定的促进作用;然而,不动杆菌和假单胞菌在青贮末期再次出现,影响了青贮品质和有氧稳定性。随着分子技术的快速发展,高通量测序技术为深入了解青贮微生物群落变化提供了技术支撑。然而,近年来,研究多集中于对青贮发酵过程的分析,而对于有氧暴露阶段的关注则相对较少。

为全面了解冻融对燕麦青贮有氧稳定性的影响,本研究在燕麦青贮 60 d 后进行有氧暴露试验,旨在探究其在有氧暴露阶段的品质变化及微生物演替情况。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 青贮调制

试验材料选用乳熟期的燕麦,留茬高度为 10 cm。刈割后的燕麦使用揉丝机切割并揉丝成 1–2 cm 长度,经短暂晾晒后充分混匀。在所有材料充分混合后,随机取约 700 g 的材料装入无菌抽真空袋(直径×高度: 20 cm×30 cm),并进行抽真空处理。试验设计采用双因素完全随机方式,温度分别是恒温 20 °C (20 组)和冻融条件(S 组,在 20 °C 和 –5 °C 每 12 h 交替 1 次,即

20 °C/–5 °C,温度切换时以每分钟 0.3 °C 的速率变化直到稳定),取样时间点设定为青贮后的 60 d,以及有氧暴露后的 1、3、5 d,每个处理设置 3 个重复。

### 1.2 有氧稳定性监测

在青贮 60 d 后,从每个处理中均匀取出 1 kg 的样品放入 2 L 的灭菌烧杯中压实,并用两层灭菌棉纱布覆盖。将样品分别在其原始处理温度和室温(25±2) °C 条件下放置 5 d。使用实时温度记录仪(神华科技股份有限公司)每 5 min 测量 1 次青贮核心区域(深度为 10 cm)的温度,持续检测。分别在有氧暴露后的 1、3、5 d 分别取样,进行微生物计数和发酵品质分析。有氧稳定性的评估基于暴露于空气中的青贮饲料的温度超过基准环境温度 2 °C 所持续的时间<sup>[10]</sup>。

### 1.3 青贮发酵品质和营养成分分析

样品于 65 °C 烘箱中烘干至恒重,以测定其干物质含量(dry matter, DM)。粉碎后过 0.6 mm 筛用于测定其他营养成分。粗蛋白含量(crude protein, CP)采用杜马斯燃烧定氮法测定<sup>[11]</sup>。可溶性糖含量使用植物可溶性糖(water-soluble carbohydrates, WSC)含量试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)进行测定。中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)依据 Van Soest 等<sup>[12]</sup>方法进行测定。取 20 g 样品置于 180 mL 无菌蒸馏水中浸提 24 h 后过滤,一部分滤液用 pH 计(上海仪电分析仪器有限公司)测量 pH 值,剩余滤液分别用于氨态氮和有机酸的测定。氨态氮采用苯酚-次氯酸钠比色法进行测定<sup>[13]</sup>。有机酸则使用超高效液相色谱仪进行测定,滤液通过 0.22  $\mu$ m 滤头过滤至进样瓶中,采用赛默飞 UltiMate 3000 超高效液相色谱仪测定乳酸、乙酸、丙酸和丁酸。色谱条件为: RSpak KC-811 色谱柱,流动相 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,流速 0.5 mL/min,柱温 55 °C。

## 1.4 微生物计数

青贮微生物计数采用平板计数法<sup>[14]</sup>。取 20 g 样品浸没于 180 mL 灭菌生理盐水(0.85%)中, 在 4 °C、120×g 振荡 1 h, 然后用灭菌蒸馏水依次稀释至 10<sup>-5</sup>, 从中取原液、10<sup>-3</sup>、10<sup>-5</sup> 这 3 个梯度各 0.1 mL 进行涂布。分别使用 MRS 培养基 37 °C 厌氧培养 48 h 对乳酸菌进行计数, 使用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 30 °C 有氧培养 72 h 对酵母菌和霉菌进行计数, 使用结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)培养基在 37 °C 有氧培养 24 h 对肠杆菌进行计数, 每个梯度每种培养基设置 3 个重复。

## 1.5 微生物测序

将 20 g 的青贮样品中加入 180 mL 灭菌蒸馏水, 在 4 °C 振荡 30 min, 通过两层灭菌纱布过滤后 4 °C、10 000×g 离心 10 min, 倒掉上清液, 加入 3 mL 灭菌蒸馏水重制成混合菌液。采用 CTAB 方法对样品的基因组 DNA 进行提取, 之后使用琼脂糖凝胶电泳检测提取出的 DNA 纯度和浓度。随后取适量 DNA 于离心管中, 并用无菌水稀释至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据扩增区域选择使用带 barcode 的特异性引物、New England Biolabs 公司的 Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR, 以确保扩增效率和准确性。细菌序列使用特异性引物 515F (5'-GTTTCGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GCCAATGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 16S rRNA 基因的 V4 区; 真菌序列使用特异性引物 ITS5-1737F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS2-2043R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 对样品真菌基因组 DNA 进行扩增。PCR 反应体系: PCR 混合液加入 15 μL Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs 公司)、0.2 μmol/L 引物和

10 ng 基因组 DNA 模板。反应条件: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 次循环; 72 °C 保持 5 min。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 对检测合格的 PCR 产物进行磁珠纯化, 并采用酶标定量。根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。对目的条带使用胶回收试剂盒(Qiagen 公司)回收产物。使用 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II DNA Library Prep Kit 进行文库构建, 将构建好的文库进行 Qubit 和 qPCR 定量。待文库合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序, 并进行后续的数据分析。使用 FLASH (v1.2.7) 对每个样本的 reads 进行拼接。参照 QIIME (v1.9.1) 的 Tags 质量控制流程, 得到最终的有效序列。利用 Uparse 算法 (v7.0.1001) 对所有样本的全部有效序列进行聚类, 默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs。使用 MUSCLE (3.8.31) 软件进行快速多序列比对, 得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系。使用 QIIME 软件 (v1.9.1) 计算 α 和 β 多样性指数, 并用 R 软件 (v2.15.3) 进行可视化展示。微生物测序数据已上传至 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 登录号为 PRJNA1184690。

采用 SPSS (IBM SPSS Statistics 26) 软件进行双因素方差分析, 旨在探讨温度和青贮阶段及其交互作用对有氧暴露阶段所有指标的影响, 并应用 Tukey's HSD 检验方法确定差异显著性水平 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵品质分析

青贮 60 d 及开袋后有氧暴露的发酵特性如表 1 所示, 随着有氧暴露时间的延长 pH 值升高。在室温下有氧暴露 1 d 后, S 组的 pH 值升

表1 燕麦青贮60 d和有氧暴露过程中的发酵特性

Table 1 Fermentation characteristics of oat silage ensiled for 60 days and during aerobic exposure

时间 Time	温度 <i>T</i> /°C	pH	氨态氮 NH <sub>3</sub> -N (%)	乳酸 Lactic acid (mg/g)	乙酸 Acetic acid (mg/g)	丙酸 Propionic acid (mg/g)	丁酸 Butyric acid (mg/g)
Day 60	20	4.62k	3.50f	48.03a	11.87c	ND	ND
	20/-5	4.92h	4.24de	28.06c	12.74c	ND	ND
AE Day 1	AE 20	4.67hi	3.88ef	41.36b	18.26a	ND	ND
	AE 20/-5	5.24g	4.19de	19.95d	15.62b	ND	ND
	RT AE 20	4.73hi	3.86ef	18.44e	18.64a	ND	ND
	RT AE 20/-5	7.10e	4.25de	5.75h	14.71b	0.44d	1.31d
AE Day 3	AE 20	6.71f	4.25de	13.90f	13.08c	ND	ND
	AE 20/-5	7.76d	4.43de	3.05jk	9.84d	ND	ND
	RT AE 20	8.03c	4.61d	3.48i	12.19c	ND	ND
	RT AE 20/-5	8.46b	4.68d	3.99i	7.18e	2.44b	3.11b
AE Day 5	AE 20	7.71d	6.29c	7.68g	9.84d	ND	ND
	AE 20/-5	8.09c	6.30c	2.17kl	6.44ef	ND	1.15e
	RT AE 20	8.45b	7.61b	1.89l	9.22d	1.35c	2.13c
	RT AE 20/-5	8.81a	8.58a	1.65l	5.48f	2.71a	4.40a
SEM		0.091	0.103	1.003	0.166	0.133	0.175
Period		**	*	**	**	*	**
Temperature		**	**	**	**	NS	**
Period×Temperature		NS	NS	**	**	NS	NS

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著(\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ); NS: 不显著; SEM: 标准误; DM: 干物质; AE: 有氧暴露; RT: 室温; ND: 未检测到。

The same column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 level (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ); NS: Not significant; SEM: Standard error of mean; DM: Dry matter; AE: Aerobic exposure; RT: Room temperature; ND: Not detected.

高至 7.10, 5 d 后最终超过了 8.00。在整个有氧暴露过程中, S 组在室温下的 pH 值始终显著高于同一时段在原温度下的 pH 值( $P<0.05$ )。20 组除第 1 天外, 第 3 天和第 5 天的 pH 值也呈现出同样的趋势。NH<sub>3</sub>-N 含量不断上升, 而乳酸含量快速下降, 特别是 S 组。乙酸含量先上升后下降, 而丙酸和丁酸在 S 组有氧暴露后被检测到, 并且随着有氧暴露时间的延长其含量逐渐增加。与原温度下的有氧暴露相比, 室温下的有氧暴露导致 pH 值和氨态氮含量上升更快, 乳酸和乙酸含量下降更快。在 S 组, 尤其是在室温下有氧暴露时, 丙酸和丁酸的生成速度

更快。乳酸和乙酸与时间段、温度以及两者的交互作用均存在极显著的相关性( $P<0.01$ )。pH 值和丁酸与时间段、温度也呈现极显著的相关性( $P<0.01$ ), 但与两者的交互作用无显著相关性。

## 2.2 营养成分分析

如表 2 所示, 有氧暴露 5 d 后, 20 组和 S 组的灰分均显著升高( $P<0.05$ ), 同时中性洗涤纤维的含量也显著增加。然而, 在有氧暴露 5 d 后, 20 组和 S 组之间的中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量无显著差异。粗蛋白的含量显著下降( $P<0.05$ ), 但不同处理间无显著差异。S 组的可

表2 燕麦青贮60 d和有氧暴露5 d的营养品质

Table 2 Nutritional components in silage ensiled for 60 days and aerobic exposure for 5 days

时间 Time	温度 T/°C	灰分 Ash (%)	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (%)	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	可溶性糖 Water-soluble carbohydrates (%)
Day 60	20	10.14d	56.98b	35.97b	8.67a	4.96a
	20/-5	11.26c	59.03b	40.81ab	8.93a	4.84ab
AE Day 5	AE 20	11.91b	69.64a	43.85a	7.54b	4.33ab
	AE 20/-5	11.45c	67.83a	41.95ab	7.97b	4.24ab
	RT AE 20	12.79a	70.25a	41.01ab	7.82b	4.11b
	RT AE 20/-5	12.47a	67.22a	37.26ab	7.62b	3.33c
SEM		0.105	1.939	2.157	0.062	0.096

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著；SEM：标准误；DM：干物质；AE：有氧暴露；RT：室温。

The same column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 level. SEM: Standard error of mean; DM: Dry matter; AE: Aerobic exposure; RT: Room temperature.

溶性糖含量在有氧暴露 5 d 后显著下降( $P<0.05$ ), 并且在室温下进行有氧暴露的样品中, 可溶性糖含量的下降速度更快( $P<0.05$ )。

### 2.3 微生物计数

如表 3 所示, 在青贮 60 d 开袋时, S 组中检测到了肠杆菌, 而 20 组和 S 组中均未检测到酵母菌。随着有氧暴露时间的推移, 肠杆菌和酵母菌的数量不断增加, 乳酸菌的数量则不断减少( $P<0.05$ )。在 S 组有氧暴露 3 d 后检测到霉菌, 而 20 组在有氧暴露 5 d 后才检测到霉菌, S 组在室温下进行有氧暴露时, 霉菌的数量显著多于其他处理( $P<0.05$ )。有氧暴露 5 d 后, 各处理下肠杆菌的计数差异显著( $P<0.05$ )。肠杆菌的数量与时间阶段和温度均呈极显著相关性, 但与两者的交互作用无相关性。乳酸菌的计数与时间阶段、时间阶段与温度的交互作用极显著相关( $P<0.01$ ), 与温度也呈显著相关性( $P<0.05$ )。酵母菌的计数与时间阶段和时间阶段与温度的交互作用极显著相关( $P<0.01$ ), 但与温度无显著相关性。霉菌的计数与时间阶段、温度及两者的交互作用均呈极显著相关性( $P<0.01$ )。

### 2.4 微生物演替分析

通过  $\alpha$  多样性分析, 发现细菌的 ACE 和 Chao1 这 2 个指数无显著差异, 而 Shannon 指数和 Simpson 指数差异显著, 20 组和 S 组在室温下进行有氧暴露时, Shannon 指数和 Simpson 指数不断增加, 5 d 后达到最高, 且显著高于其他处理( $P<0.05$ ); 而在原温度下进行有氧暴露时, Shannon 指数和 Simpson 指数则先减小后增加。Shannon 指数和 Simpson 指数与时间段和温度均呈极显著相关性( $P<0.01$ ), 而时间段与温度的交互作用与 Shannon 指数无显著相关性, 但与 Simpson 指数呈显著相关性( $P<0.05$ )。真菌的  $\alpha$  多样性指数在有氧暴露阶段均降低, 且各处理间的差异显著( $P<0.05$ )。ACE 指数和 Chao1 指数与时间段、温度以及两者的交互作用均呈极显著相关性( $P<0.01$ ), Shannon 指数和 Simpson 指数与时间段和温度极显著相关, 但与两者的交互作用无显著相关性(表 4)。

S 组中促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)的相对丰度较高, 而 20 组中广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度则较为显著(图 1A)。观察各个时间段的细

表3 燕麦青贮60 d和有氧暴露过程中的微生物计数

Table 3 Microorganism counts of oat silage ensiled for 60 days and during aerobic exposure (lg CFU/g)

时间 Time	温度 T/°C	肠杆菌 Coliform bacteria	乳酸菌 Lactic acid bacteria	酵母菌 Yeasts	霉菌 Molds
Day 60	20	ND	5.04de	ND	ND
	20/-5	4.42ef	5.37c	ND	ND
AE Day 1	AE 20	ND	5.41c	3.82f	ND
	AE 20/-5	4.25f	6.01a	4.18ef	ND
	RT AE 20	ND	4.32g	3.00g	ND
	RT AE 20/-5	4.3ef	5.27cd	4.42de	ND
AE Day 3	AE 20	ND	5.39c	5.31ab	ND
	AE 20/-5	6.21a	5.77ab	4.82c	2.62d
	RT AE 20	4.53d	5.66b	5.46ab	ND
	RT AE 20/-5	5.12c	5.76ab	4.68cd	3.93b
AE Day 5	AE 20	2.15g	4.96ef	5.06bc	2.54de
	AE 20/-5	6.24a	4.79ef	4.89c	2.97c
	RT AE 20	4.97c	4.71f	5.69a	2.43e
	RT AE 20/-5	5.61b	4.35g	5.45ab	4.71a
SEM		0.187	0.053	0.053	0.075
Period		**	**	**	**
Temperature		**	*	NS	**
Period×Temperature		NS	**	**	**

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著(\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ); NS: 不显著; SEM: 标准误; AE: 有氧暴露; RT: 室温; ND: 未检测到。

The same column followed by different lowercase letters are significantly different (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ). NS: Not significant; SEM: Standard error of mean; AE: Aerobic exposure; RT: Room temperature; ND: Not detected.

菌相对丰度图(图 1B)可以发现, 20 组中的广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)在有氧暴露后先增加, 5 d 后减少, 而 S 组中逐渐减少。芽孢杆菌属(*Bacillus*)在 2 个处理中均是先增加后减少, 且室温下有氧暴露时其增加的趋势出现得更早。明串珠菌属(*Leuconostoc*)随着有氧暴露时间的延长而逐渐减少, 赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)在室温下有氧暴露 5 d 时大幅增加, 尤其是 20 组。*Hafnia-Obesumbacterium* 在 S 组原温度有氧暴露的第 3 天和第 5 天时具有较高的丰度。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)随着有氧暴露时间的延长而逐渐增加。细菌韦恩图(图 1E)显示, 有氧暴露 5 d 后, 20 组和 S 组共有 OTUs 为 167

个, 20 组在原温度和室温下有氧暴露处理的特有 OTUs 分别为 42 个和 47 个, 而 S 组特有 OTUs 分别为 51 个和 71 个。根据真菌相对丰度图(图 1C)可知, 与 S 组相比, 20 组中的青霉菌属(*Penicillium*)和 *Wickerhamomyces* 的相对丰度较高, 而毕赤酵母(*Pichia*)的相对丰度较低。S 组中的 *Issatchenkia*、镰刀菌属(*Fusarium*)和毛霉菌属(*Mucor*)的相对丰度高于 20 组。在整个有氧暴露过程中(图 1D) 20 组和 S 组的真菌组成结构不同, 变化也不同, 20 组的 *Wickerhamomyces* 先增加后减少, 而室温下有氧暴露的 S 组中的 *Issatchenkia* 的丰度逐渐增加。根据真菌韦恩图(图 1F)发现, 20 组在原温度和室温下有氧暴露

表4 燕麦青贮60 d和有氧暴露过程中的微生物多样性指数

Table 4 Alpha diversity of oat silage ensiled for 60 days and during aerobic exposure

时间 Time	温度 T/°C	细菌 Bacteria				真菌 Fungi			
		Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Chao1	ACE
Day 60	20	3.37d	0.81de	283.48	281.74	4.26a	0.87a	549.32a	562.44a
	20/-5	2.97e	0.73g	252.28	261.59	3.29b	0.80a	297.60bc	195.57d
AE Day 1	AE 20	2.96e	0.79e	227.27	233.76	1.28def	0.41cd	172.93def	190.97d
	AE 20/-5	2.53f	0.69h	236.86	250.93	1.44cdef	0.38cde	206.11cde	212.14d
	RT AE 20	3.50cd	0.84cd	280.91	285.38	1.81cd	0.48bc	274.41bcd	289.26c
	RT AE 20/-5	3.00e	0.74fg	253.33	265.44	1.11ef	0.27de	175.26def	195.83d
AE Day 3	AE 20	3.02e	0.79e	226.15	241.89	1.72cde	0.62b	94.95efg	137.5def
	AE 20/-5	2.98e	0.78ef	252.55	258.01	0.92f	0.22e	43.05g	45.69g
	RT AE 20	3.75bc	0.87bc	242.27	250.92	2.05c	0.61b	356.63b	359.74b
	RT AE 20/-5	3.95b	0.88b	248.86	266.45	1.15def	0.32cde	77.80fg	85.70efg
AE Day 5	AE 20	3.65cd	0.87bc	230.30	242.80	1.74cde	0.63b	55.79fg	55.41g
	AE 20/-5	3.46d	0.84cd	243.80	259.22	1.16def	0.28de	69.30fg	72.53fg
	RT AE 20	4.44a	0.91ab	285.34	282.53	1.21def	0.42cd	84.38efg	85.29efg
	RT AE 20/-5	4.70a	0.94a	286.79	286.45	1.50cdef	0.40cde	148.38efg	157.55de
SEM		0.061	0.007	5.037	4.896	0.061	0.018	13.865	10.661
Period		**	**	NS	NS	**	**	**	**
Temperature		**	0.003**	NS	NS	**	**	0.001**	**
Period×Temperature		0.054	0.031*	NS	NS	NS	0.05	0.005**	**

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著(\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ); NS: 不显著; SEM: 标准误; AE: 有氧暴露; RT: 室温。

The same column followed by different lowercase letters are significantly different (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ). NS: Not significant; SEM: Standard error of mean; AE: Aerobic exposure; RT: Room temperature.

处理的特有 OTUs 分别为 7 个和 14 个, 而 S 组原温度和室温下暴露处理的特有 OTUs 分别为 29 个和 222 个。

细菌 LEfSe 分析(图 2)进一步揭示了不同处理组在不同时间段的生物标志物。青贮 60 d 后, 20 组主要以明串珠菌属(*Leuconostoc*)为生物标志物(biomaker)(图 2A)。有氧暴露 1 d 后(图 2B), 20 组在室温下有氧暴露的 biomakers 为广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。相比之下, S 组在原处理温度下有氧暴露的 biomakers 为促进乳杆菌属(*Levilactobacillus*)、*L. brevis* 和 *Hafnia-Obesumbacterium*; 在室温下有氧暴露的 biomakers 为 *Enterobacteriaceae*。有氧

暴露 3 d 后(图 2C), 20 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*), 室温下有氧暴露的 biomakers 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*); S 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为促进乳杆菌属(*Levilactobacillus*)、*L. brevis* 和 *Hafnia-Obesumbacterium*, 室温下有氧暴露的 biomakers 为肠球菌属(*Enterococcus*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。有氧暴露 5 d 后(图 2D), 20 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*), 在室温下有氧暴露的 biomakers 为赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)

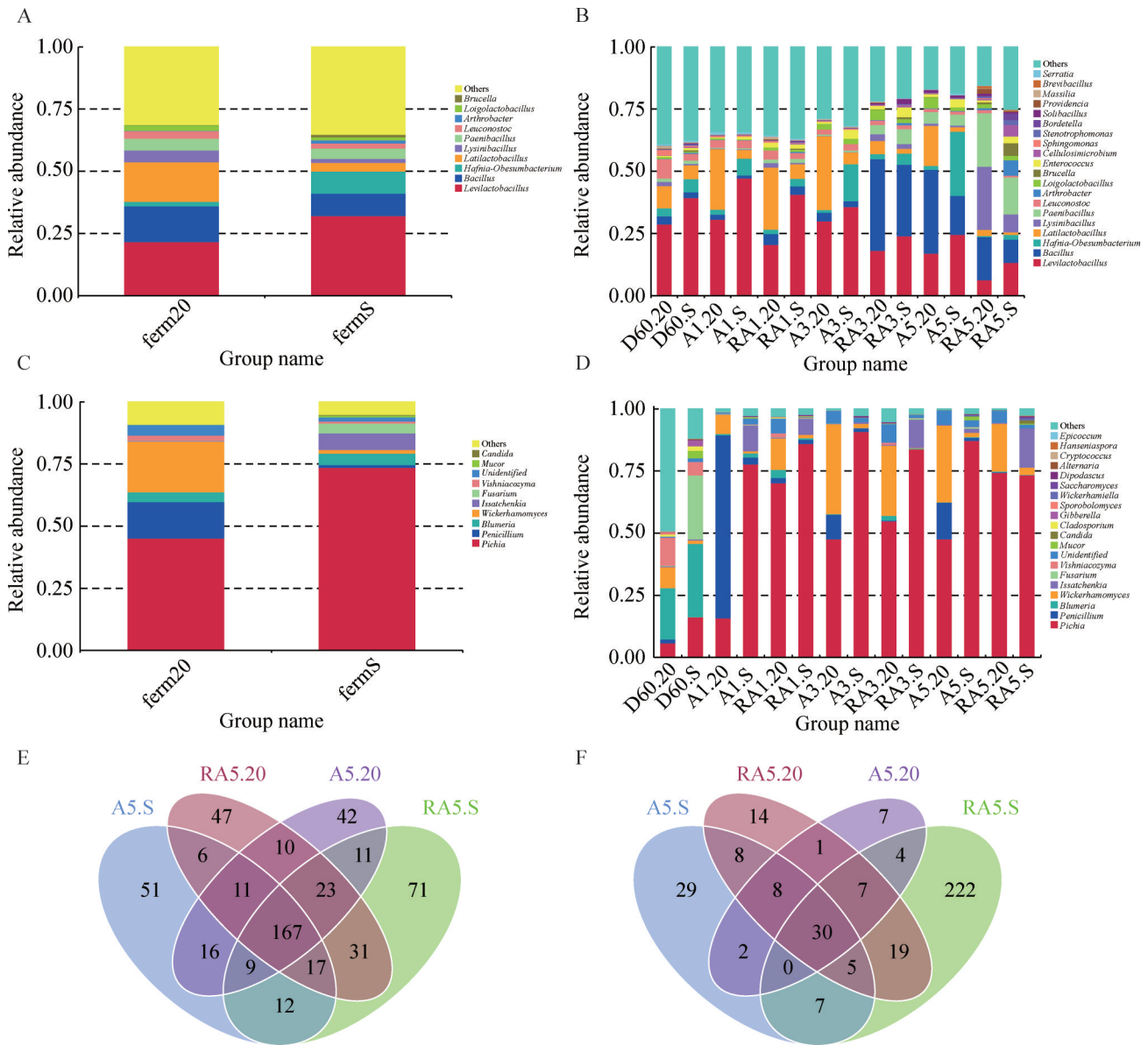


图1 有氧暴露过程中细菌和真菌群落分析。A: 20组与S组在有氧暴露阶段的细菌相对丰度比较；B: 20组与S组在有氧暴露各个阶段的细菌相对丰度；C: 20组与S组在有氧暴露阶段的真菌相对丰度比较；D: 20组与S组在有氧暴露各个阶段的真菌相对丰度；E: 有氧暴露5 d后各个处理细菌韦恩图；F: 有氧暴露5 d后各个处理真菌韦恩图。A表示原温度有氧暴露；RA表示室温下有氧暴露。

Figure 1 Bacterial and fungal community during aerobic exposure. A: Comparison of the relative abundance of bacteria during the aerobic exposure phase between group 20 and group S; B: The relative abundance of bacteria at various days of aerobic exposure between group 20 and group S; C: Comparison of relative abundance of fungi during the aerobic exposure phase between group 20 and group S; D: The relative abundance of fungi at various days of aerobic exposure between group 20 and group S; E: Venn plots of bacteria after 5 days aerobic exposure; F: Venn plots of fungi after 5 days aerobic exposure. A: Aerobic exposure under freeze-thaw; RA: Aerobic exposure at room temperature.

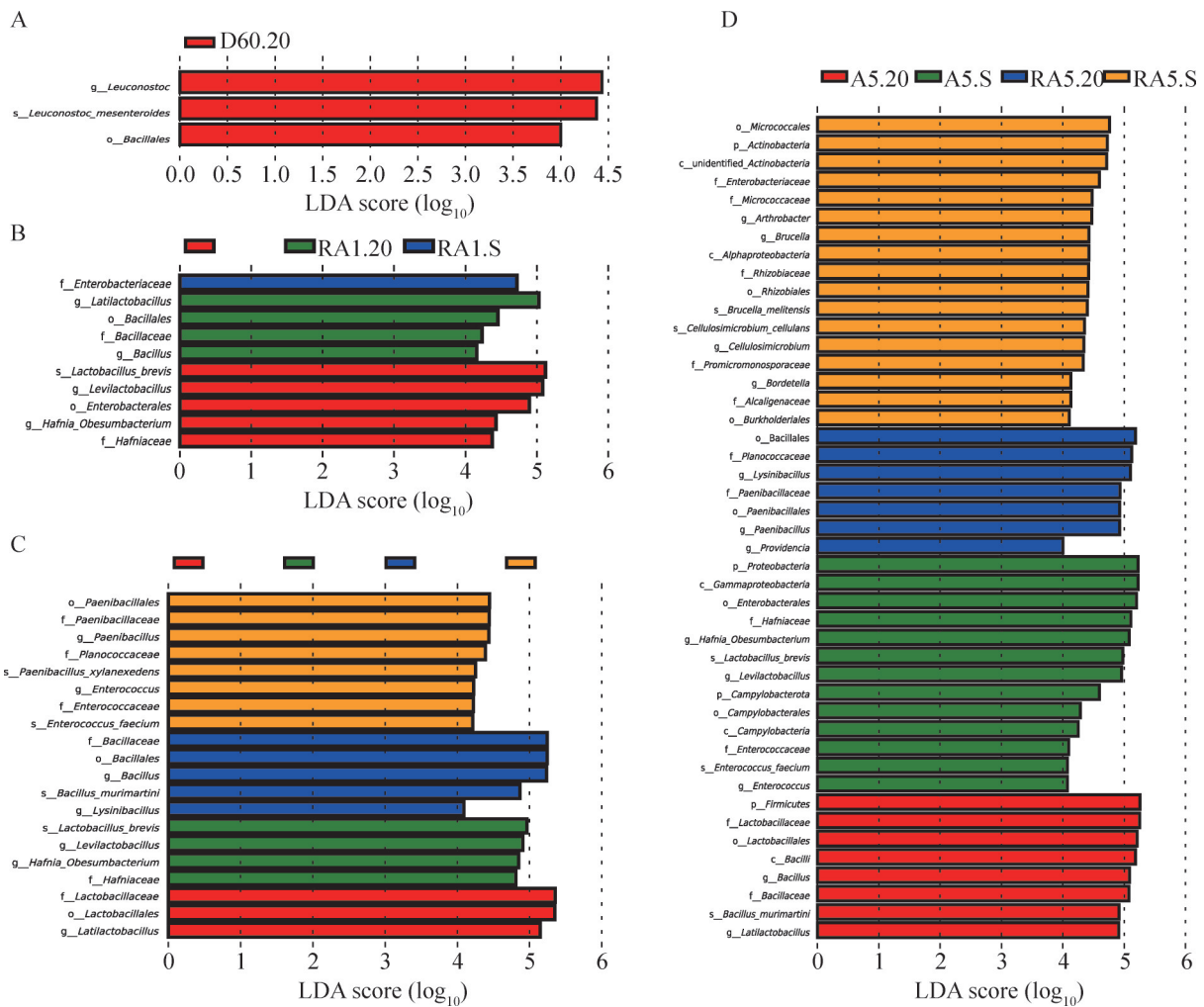


图2 有氧暴露阶段细菌LEfSe分析。A: 60 d开袋; B: 有氧暴露1 d; C: 有氧暴露3 d; D: 有氧暴露5 d。

Figure 2 Bacterial variations in samples during aerobic exposure using LEfSe analysis. A: 60 days silage; B: Aerobic exposure for 1 day; C: Aerobic exposure for 3 days; D: Aerobic exposure for 5 days.

和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*); S组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)、*L. brevis*, *Hafnia-Obesumbacterium* 和肠球菌属(*Enterococcus*); 在室温下有氧暴露的 biomakers 为节杆菌属(*Arthrobacter*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*) 和 *Brodetella*。

根据真菌 LEfSe 分析(图 3), 青贮 60 d 后 20 组中的 biomakers 有青霉菌属(*Penicillium*)、

*Vishniacozyma* 和 *Wickerhamomyces*; S 组中的 biomakers 为镰刀菌属(*Fusarium*)、毛霉菌属(*Mucor*)和 *Gibberella* (图 3A)。有氧暴露 1 d 后(图 3B), 20 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为青霉菌属(*Penicillium*); 在室温下有氧暴露的 biomakers 为 *Acremonium*、*Wickerhamomyces*、*Saccharomycetaceae*\_sp. 和 *Blumeria*。S 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为 *Issatchenkia*; 在室温下有氧暴露的 biomakers 为毕赤酵母(*Pichia*)。

有氧暴露 3 d 后(图 3C), 20 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为青霉菌属(*Penicillium*)和 *Wickerhamomyces*; 在室温下有氧暴露的 biomakers 为 *Saccharomycetaceae*\_sp. 和 *Alternaria*。S 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为毕赤酵母(*Pichia*), 在室温下有氧暴露的 biomakers

为 *Issatchenkia*。有氧暴露 5 d 后(图 3D), 20 组在原温度下有氧暴露的 biomakers 为青霉菌属(*Penicillium*)、*Wickerhamomyces* 和 *Saccharomycetaceae*\_sp.; S 组在原温度下有氧暴露的 biomaker 为 *Fusarium*\_sp.; 在室温下有氧暴露的 biomaker 为 *Issatchenkia*。

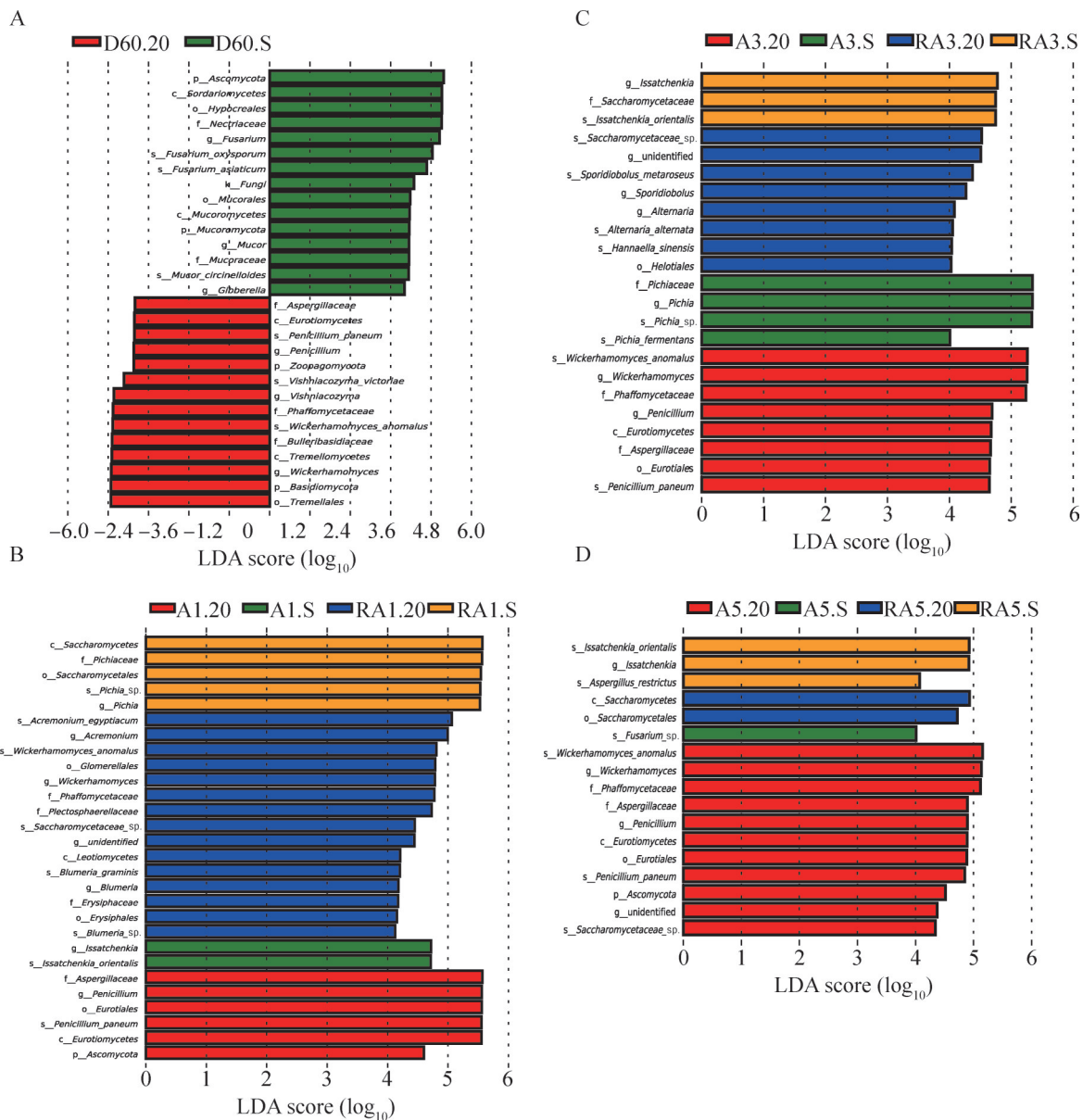


图3 有氧暴露阶段真菌LEfSe分析。A: 60 d开袋; B: 有氧暴露1 d; C: 有氧暴露3 d; D: 有氧暴露5 d。  
 Figure 3 Fungal variations in samples during aerobic exposure using LEfSe analysis. A: 60 days silage; B: Aerobic exposure for 1 day; C: Aerobic exposure for 3 days; D: Aerobic exposure for 5 days.

通过 matestate 分析(图 4), 20 组和 S 组之间的差异细菌(图 4A)主要有片球菌属(*Pediococcus*)、广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)、乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)等, 其中前 4 个菌属在 20 组中的数量显著多于 S 组, 而后 4 个菌属在 S 组中的数量显著多于 20 组( $P<0.05$ )。20 组和 S 组之间的差异真菌(图 4B)主要有青霉菌属(*Penicillium*)、

毕赤酵母(*Pichia*)、*Issatchenkia*、*Wickerhamiella*和 *Wickerhamomyces* 等, 其中除青霉菌属(*Penicillium*)和 *Wickerhamomyces* 在 20 组中的数量显著多于 S 组外, 其余均是 S 组显著多于 20 组( $P<0.05$ )。

通过细菌与发酵指标的相关性分析(图 5), 在 20 组(图 5A)中 pH 值与明串珠菌属(*Leuconostoc*)、促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)

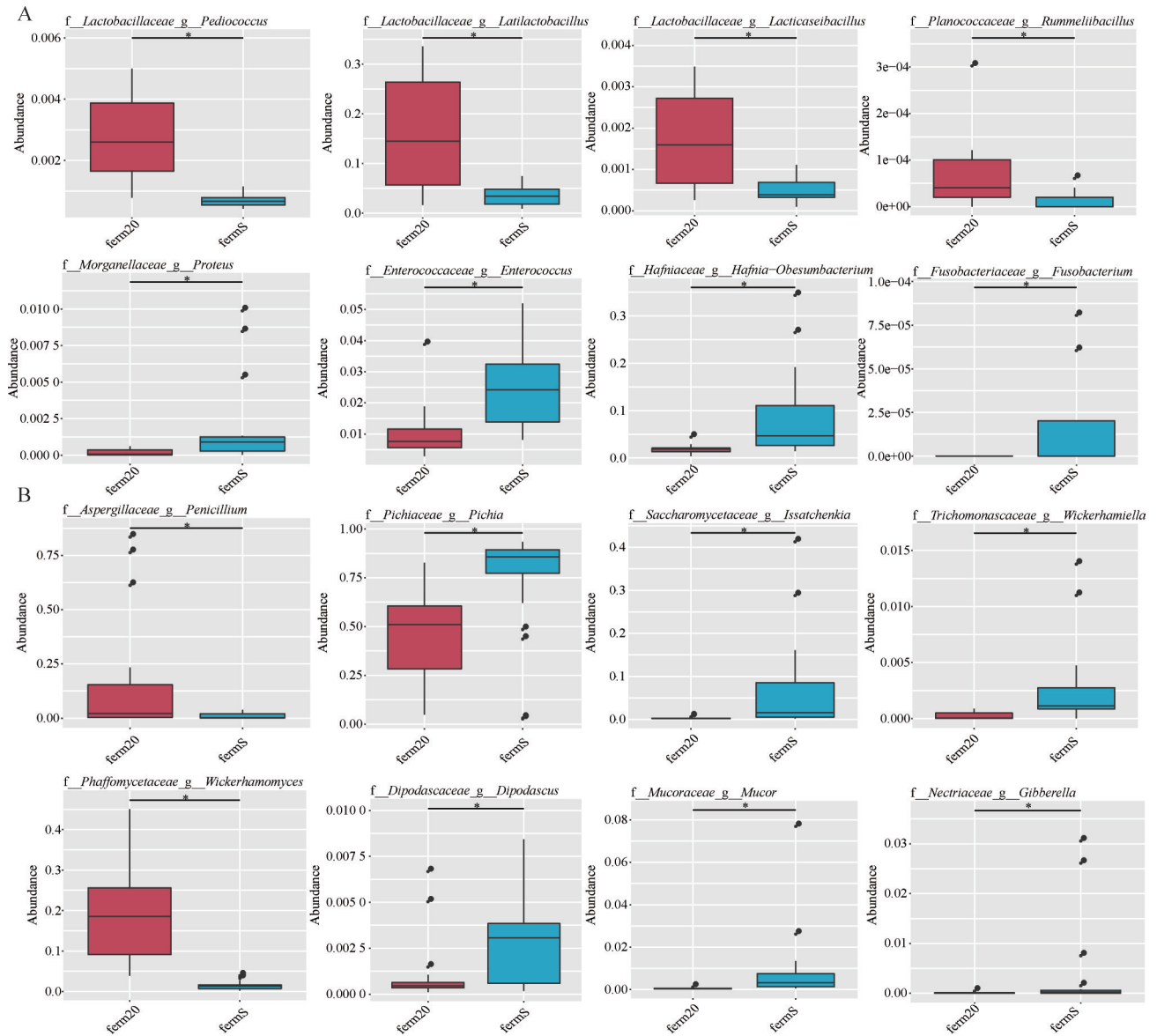


图4 细菌(A)和真菌(B)群落的matestate分析

Figure 4 Matestate analysis of bacterial (A) and fungal (B) communities. \*:  $P<0.05$ .

和广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)呈极显著负相关, 与芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)、腐败乳杆菌属(*Loigolactobacillus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)呈极显著正相关( $P<0.01$ )。LA与明串珠菌属(*Leuconostoc*)、促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)、*Hafnia-Obesumbacterium*和*Sphingomonas*呈极显著正相关, 与芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)、腐败乳杆菌属(*Loigolactobacillus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)呈极显著负相关( $P<0.01$ )。AA与明串珠菌属(*Leuconostoc*)、促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)、

广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)呈极显著正相关, 与芽孢杆菌属(*Bacillus*)和类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)呈极显著负相关( $P<0.01$ )。在S组(图5B)中, 促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*)和广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)与pH和氨态氮呈极显著负相关, 与LA和AA呈极显著正相关( $P<0.01$ )。芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)与pH值呈极显著正相关( $P<0.01$ )。类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)与LA和AA呈极显著负相关, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)与PA和BA呈极显著正相关。

通过真菌与发酵指标的相关性分析(图6)可

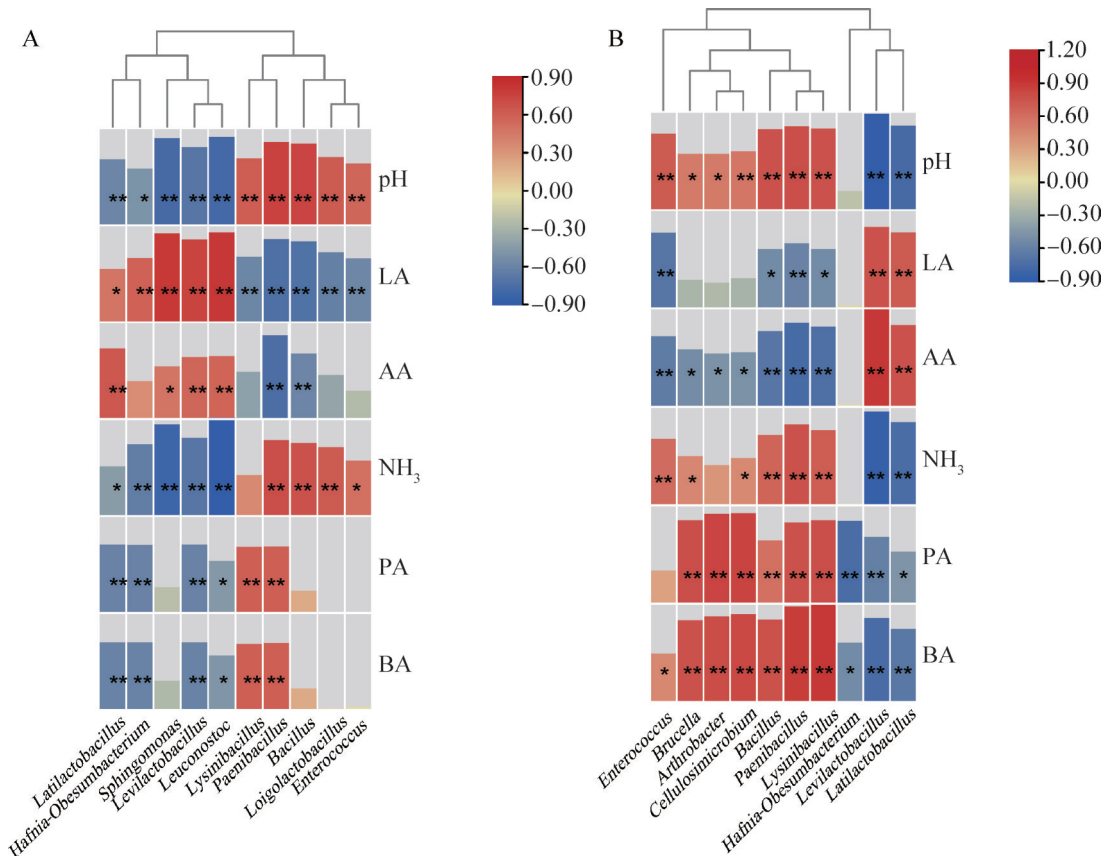


图5 有氧暴露阶段20组(A)和S组(B)的细菌群落与发酵指标的相关性分析

Figure 5 The correlation analysis of silage quality and differential bacteria communities at 20 °C (A) and freeze-thaw condition (B) during aerobic exposure. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

知, 在 20 组中(图 6A), 青霉菌属(*Penicillium*)与 pH 值呈极显著负相关, 与 LA 和 AA 呈显著正相关 ( $P<0.05$ ), 而毕赤酵母 (*Pichia*) 和 *Wickerhamomyces* 与 pH 和氨态氮呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ), 与 LA 呈极显著负相关 ( $P<0.01$ )。在 S 组中(图 6B), *Candida* 与 pH 值极显著正相关, 与 LA 极显著负相关。 *Blumeria* 和 *Vishniacozyma* 与 pH 和氨态氮呈极显著负相关 ( $P<0.01$ ), 与 LA 和 AA 呈极显著正相关 ( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 有氧暴露后青贮发酵品质和营养成分的变化

青贮饲料的有氧稳定性是确保其营养价值

不受损失、有效抑制霉菌孢子及霉菌毒素污染, 进而为动物提供优质饲料的关键。青贮 60 d 后, S 组的 pH 值显著高于 20 组, 且 2 个处理下的 pH 值均高于优质青贮通常要求的 pH 4.2, 这可能受到贮存温度和原料附生乳酸菌数量的共同影响。研究表明低温 ( $<20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 会抑制青贮发酵, 导致 pH 值偏高、pH 下降速率减缓<sup>[15]</sup>以及有机酸含量降低, 而冻融条件会进一步加剧这种抑制作用。无论是 20 组还是 S 组, 在室温条件下进行有氧暴露都会加速青贮饲料的腐败过程。这可能是由于在高温高湿的有氧环境中, 酵母菌、肠杆菌以及霉菌得以迅速增殖。这些微生物会消耗发酵过程中产生的乳酸及其他可利用底物, 特别是在 S 组中, 肠杆菌、酵母菌及霉

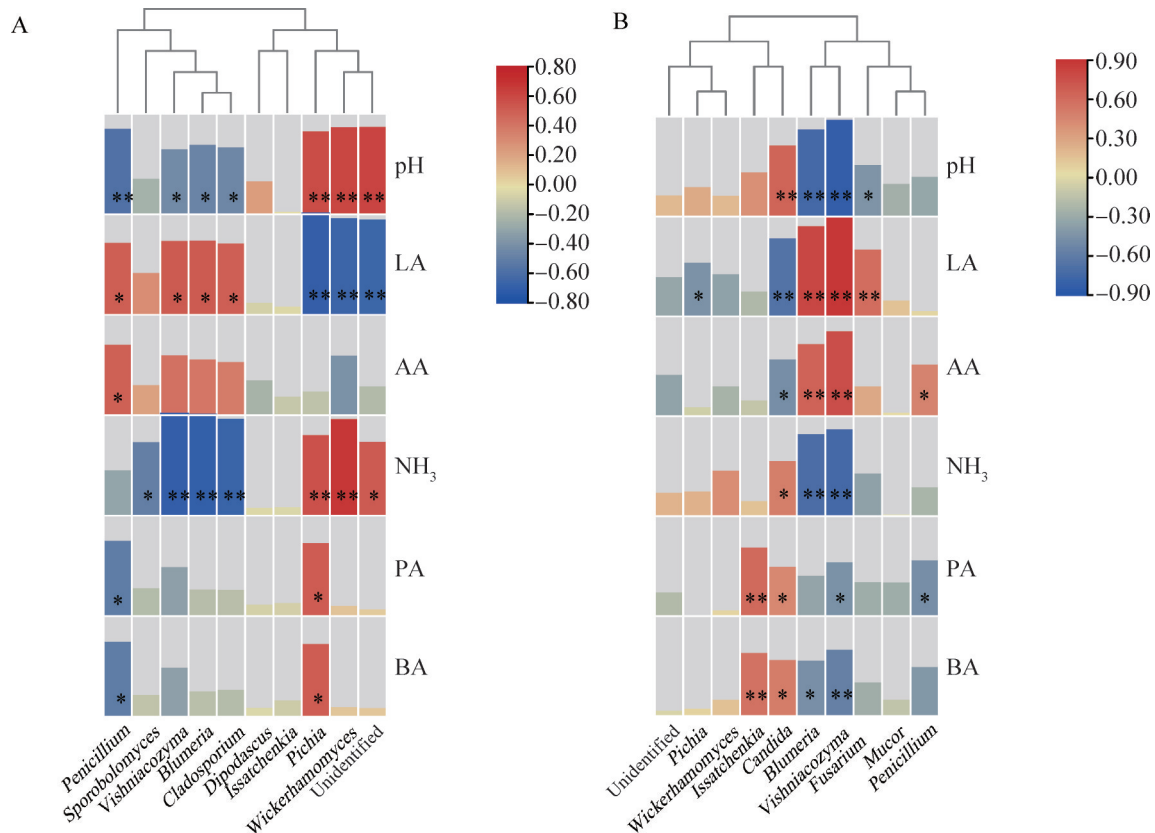


图6 有氧暴露阶段20组(A)和S组(B)的真菌群落与发酵指标的相关性分析

Figure 6 The correlation analysis of silage quality and differential fungal communities at 20 °C (A) and freeze-thaw condition (B) during aerobic exposure. \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ .

菌的增长更为显著。研究发现, 有氧变质过程中主要涉及的生化和微生物因素包括 DM、乙酸、丁酸以及酵母菌和霉菌, 其中由于霉菌具有孢子且繁殖需要时间, 因此在有氧暴露过程中的微生物演替中较晚出现, 而有氧变质初期主要是酵母菌起主导作用<sup>[16]</sup>。酵母菌兼性厌氧且耐酸, 因此是有氧暴露阶段最先出现的微生物<sup>[17]</sup>, 这与本研究结果一致, 即霉菌较酵母菌出现得晚。值得注意的是, S 组在青贮 60 d 开袋时即已检测到肠杆菌的存在, 这合理解释了为何 20 组的氨态氮含量显著低于 S 组。肠杆菌和梭菌作为关键的蛋白水解微生物, 随着其数量的增加, 蛋白质不断水解, 导致氨态氮含量持续上升。此外, 20 组和 S 组在有氧暴露 1 d 后的肠杆菌数量和氨态氮含量与青贮 60 d 时的差异并不显著, 显示出肠杆菌与氨态氮之间的密切相关性。

### 3.2 有氧暴露后细菌多样性的变化及其影响

青贮 60 d 后, 20 组和 S 组中的乳酸菌相关 OTUs 占主导地位, 但其丰度相对较低, 并非绝对优势菌, 这与前人的研究结果不一致<sup>[18]</sup>。这可能是由于本研究采用的青贮原料附生的乳酸菌数量较少或竞争力不足, 难以维持稳定的高乳酸菌丰度。如表 4 所示, 有氧暴露后细菌的 ACE 指数和 Chao1 指数并未发生显著变化, 表明这一过程中细菌的种类数与丰富度变化不显著<sup>[1]</sup>, Shannon 指数和 Simpson 指数随着有氧暴露时间的延长而逐渐增加, 反映出乳酸菌丰度的不断降低, 特别是在有氧暴露第 3 天时, 细菌群落结构出现明显不同, 与原始温度下的有氧暴露相比, 室温下的有氧暴露加速了微生物的更替, 这与韦恩图的分析结果一致, 说明室温下有氧暴露导致杂菌增多且出现得更早, 尤其是经过冻融处理的样品。片球菌属

(*Pediococcus*)、广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)、乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*)等对发酵有益的益生菌在 20 组中的数量显著多于 S 组, 而变形菌属 (*Proteus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、*Fusobacterium* 和 *Hafnia-Obesumbacterium* 在 S 组中的数量则显著多于 20 组, 变形菌属 (*Proteus*)属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*), 不发酵乳糖, 会产生苯丙氨酸和赖氨酸, 具有脱氨作用<sup>[19]</sup>, 对热敏感且不耐酸, 能在 $-20^{\circ}\text{C}$ 存活 2–3 月<sup>[20]</sup>, 这可能是其在 S 组中显著增多的原因。肠球菌属(*Enterococcus*)作为乳酸菌能够产生胞外多糖(exopolysaccharides, EPS), 具有抗氧化、抗菌、抗生物膜等活性<sup>[21]</sup>, 但是它并非绝对的益生菌, 在某些条件下与生物胺的产生和食物变质有关, 且产酸效率较低<sup>[22]</sup>, 在本研究中, 肠球菌属与发酵特性呈负相关, 尤其是在 S 组中, 可能是在冻融条件下菌株产生了脱氨和脱羧作用, 促进了蛋白质水解, 从而增加了  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量<sup>[22]</sup>。在青贮 60 d 后及整个有氧暴露期间, 20 组的芽孢杆菌属(*Bacillus*)数量相较于 S 组更为丰富。芽孢杆菌属(*Bacillus*)种类繁多, 功能各异: 部分种类能够促进发酵进程, 有效抑制有害菌群的生长, 并有助于降低蛋白水解程度和纤维含量<sup>[23]</sup>; 然而, 也有部分种类会引发罐头食品腐败及食物中毒问题<sup>[24-25]</sup>。通过相关性分析, 本研究中发现芽孢杆菌属 (*Bacillus*)与 LA 和 AA 呈负相关, 与 pH 值和  $\text{NH}_3\text{-N}$  呈正相关, 表明其抑制了发酵过程, 且 S 组中的芽孢杆菌属(*Bacillus*)还与 PA 和 BA 呈极显著正相关, 可能是在冻融条件下芽孢杆菌属 (*Bacillus*)引起了丁酸堆积和蛋白水解<sup>[26]</sup>。S 组中的 *Hafnia-Obesumbacterium* 数量多于 20 组。Wang 等<sup>[27]</sup>认为 *Hafnia-Obesumbacterium* 在青贮中与更高的乙酸、丙酸、乙醇和氨态氮含量有关, 但本研究的结果与此不完全一致, 在冻融

条件下 *Hafnia-Obesumbacterium* 显著多于 20 组,但是在冻融条件下该菌与发酵无相关性而在 20 组中却表现出促进发酵的作用。通过细菌 LEfSe 分析,有氧暴露 1 d 时,室温下暴露的 S 组的 biomarker 是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),它将竞争性地消耗底物,发生脱氨和脱羧作用<sup>[28]</sup>,加速腐败进程。到第 3 天时,室温下暴露的 S 组的 biomarker 是类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)和肠球菌属 (*Enterococcus*),类芽胞杆菌 (*Paenibacillus*)是从芽胞杆菌属后期划分出来的<sup>[29]</sup>,在有氧变质的玉米青贮中有报道,且饲料中出现的类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)是乳制品生产中非常受关注的问题<sup>[30-31]</sup>。在厌氧产孢菌中,类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)在 pH 值大于 4.5,温度高于 30 °C 时占主导地位,有研究发现该菌属与玉米青贮的有氧稳定性密切相关,可通过多种手段来抑制类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)的产生以提高玉米青贮的有氧稳定性<sup>[30]</sup>,而在本研究的 20 组中室温下有氧暴露 5 d 才成为 biomarker,这表明 20 组的有氧稳定性更好。

### 3.3 有氧暴露后真菌多样性的变化及其影响

青贮开袋前后的真菌群落结构存在显著差异。与发酵指标呈正相关的 *Blumeria* 和 *Vishniacizyma* 等真菌迅速减少,毕赤酵母 (*Pichia*)、*Wickerhamomyces* 和 *Issatchenkia* 等成为优势菌种。在大多数青贮饲料有氧暴露后,酵母菌是导致其腐败的主要原因,其中具有消耗乳酸作用的酵母,如 *Issatchenkia*、*Saccharomyces*、*Candida* 和毕赤酵母(*Pichia*),通常是青贮饲料有氧腐败的主要引发剂<sup>[2]</sup>。S 组中的毕赤酵母 (*Pichia*)、*Issatchenkia* 和 *Candida* 的数量显著多于 20 组,尤其是 S 组中的毕赤酵母(*Pichia*)在有氧暴露第 1 天时其丰度就超过了 75%,这一现象在室温下有氧暴露时尤为明显。*Wickerhamomyces*

在 20 组中的数量显著多于 S 组,有研究发现该属中的某些种会破坏敏感酵母的细胞壁<sup>[32]</sup>,这可能也是 20 组中酵母菌数量相对较少的原因之一。除了酵母菌,霉菌也是有氧暴露阶段需要重点关注的真菌,常见的主要有镰刀菌 (*Fusarium*)、青霉菌 (*Penicillium*)、曲霉菌 (*Aspergillus*)<sup>[33]</sup>。在 20 组中,青霉菌属(*Penicillium*)的数量显著多于 S 组,在有氧暴露第 1 天时,其丰度高达 73.6%,但在第 3 天时却骤然下降,可能是因为毕赤酵母(*Pichia*)在有氧暴露后迅速增加,而研究表明毕赤酵母(*Pichia*)会抑制青霉菌(*Penicillium*)的生长<sup>[34]</sup>,这也说明 S 组中青霉菌属(*Penicillium*)丰度较低的原因。另外,通过相关性分析发现青霉菌(*Penicillium*)与 pH 值呈极显著负相关,与 LA 和 AA 呈显著正相关,即青霉菌有利于发酵,有研究还发现该菌能够通过果胶酶、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等分解食品中的复杂结构元素,释放生长所需的基质,因此广泛应用于食品发酵中<sup>[35]</sup>,在青贮过程中,青霉菌可能也发挥了类似的功能,且受到处理温度的影响,因为在 S 组中并未观察到此相关性。青贮 60 d 后, S 组中的镰刀菌属(*Fusarium*)、毛霉菌属(*Mucor*)和 *Gibberella* 等是 biomarker,在有氧暴露过程中酵母菌迅速繁殖成为主要的 biomarker,但是有氧暴露 5 d 后, S 组中的 *Fusarium* sp. 和 *A. restrictus* 为主要的 biomarker。镰刀菌属(*Fusarium*)是食品和饲料中最重要的产真菌毒素的真菌属之一,其几乎所有种类均具备产生真菌毒素的能力,而常见的镰刀菌真菌毒素主要有脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1<sup>[36]</sup>。曲霉菌属(*Aspergillus*)和毛霉菌属(*Mucor*)是引起青贮腐败发霉的主要真菌<sup>[37]</sup>。有氧暴露过程中,好氧微生物通过消耗青贮饲料中的营养物质而产生热量,酵母和霉菌通过消耗有机酸(如乳酸和乙酸)提高了青贮饲

料的 pH 值和温度, 刺激了好氧和厌氧孢子形成菌的生长<sup>[30]</sup>, 这就解释了类芽胞杆菌 (*Paenibacillus*) 在有氧暴露后期丰度增加的原因, 它与酵母菌和霉菌之间存在相互联系。此外, 研究还发现, 反复的冻融过程会对 *Bacillus* 的形态产生显著影响, 并削弱其抑菌活性<sup>[13]</sup>。因此, 在 S 组中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的相对丰度明显低于 20 组。这一现象充分说明, 在有氧暴露阶段, 细菌与真菌之间存在着复杂的相互作用。

## 4 结论

有氧暴露后, 酵母和霉菌迅速代谢乳酸, 导致 pH 值不断升高, 乳酸和乙酸含量降低。同时, 细菌和真菌的种群结构也发生了变化, S 组的群落更替较快, 尤其是在室温下有氧暴露时, S 组中的好氧腐败菌更多。这表明冻融加速了有氧变败过程, 尤其是在室温下有氧暴露。

## 作者贡献声明

李海萍: 研究构思和设计, 论文撰写和修改; 贾志锋: 数据收集和处理; 刘文辉: 数据收集和处理; 马祥: 数据收集与处理; 周青平: 论文修改; 关皓: 研究构思和设计。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] LI HP, GUAN H, JIA ZF, LIU WH, MA X, LIU Y, WANG H, ZHOU QP. Freeze-thaw condition limits the fermentation process and accelerates the aerobic deterioration of oat (*Avena sativa*) silage in the Qinghai-Xizang Plateau [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 944945.
- [2] PAHLOW G, MUCK R, DRIEHUIS F, OUDE ELFERINK S, SPOELSTRA SF. *Microbiology of Ensiling*[M]. Agronomy Publication No. 42. Madison, WI: American Society of Agronomy, 2003: 31-93.
- [3] WOOLFORD MK. The detrimental effects of air on silage[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 68(2): 101-116.
- [4] BOLSEN KK, DICKERSON JT, BRENT BE, SONON RN, DALKE BS, LIN C, BOYER JE. Rate and extent of top spoilage losses in horizontal silos[J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(10): 2940-2962.
- [5] KUNG L, SHEPERD AC, SMAGALA AM, ENDRES KM, BESSETT CA, RANJIT NK, GLANCEY JL. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration[J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(5): 1322-1330.
- [6] LINDGREN S, PAHLOW G, OLDENBURG E. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality[c]. In *Proceedings of the 19th General Meeting of the EGF, La Rochelle, France, 2002*, 503-511.
- [7] JUN SM, TAKAGI H. Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 53(Pt 3): 155-164.
- [8] JI XM, LIU MH, YANG JL, FENG FJ. Meta-analysis of the impact of freeze-thaw cycles on soil microbial diversity and C and N dynamics[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 168: 108608.
- [9] DONG ZH, LI JF, CHEN L, WANG SR, SHAO T. Effects of freeze-thaw event on microbial community dynamics during red clover ensiling[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1559.
- [10] RANJIT NK, KUNG L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage[J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(3): 526-535.
- [11] LEE MH. Official methods of analysis of AOAC International (16th edn)[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6(11):382.
- [12] Van SOEST PJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [13] BRODERICK GA, KANG JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media[J]. *Journal of Dairy Science*, 1980, 63(1): 64-75.
- [14] BEUCHAT LR, COPELAND F, CURIALE MS, DANISAVICH T, GANGAR V, KING BW, LAWLIS TL, LIKIN RO, OKWUSOA J, SMITH CF, TOWNSEND DE. Comparison of the SimPlate™ total plate count method with Petrifilm™, Redigel™, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods[J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(1): 14-18.
- [15] ALI M, CONE JW, KHAN NA, HENDRIKS WH, STRUIK PC. Effect of temperature and duration of ensiling on *in vitro* degradation of maize silages in rumen fluid[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99(2): 251-257.
- [16] OHYAMA Y, HARA S, MASAKI S. Analysis of factors affecting aerobic deterioration of grass silages[C]. *Forage Conservation in the 80s BGS Occasional Symposium No 11, United Kingdom, 1980*: 257-261.

- [17] ÁVILA CLS, CARVALHO BF. Silage fermentation-updates focusing on the performance of micro-organisms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 966-984.
- [18] DUNIERE L, XU SW, LONG J, ELEKWACHI C, WANG YX, TURKINGTON K, FORSTER R, McALLISTER TA. Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 50.
- [19] DAVID B. Feigin and cherry's textbook of pediatric infectious diseases[J]. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 2011, 47(5): 319-320.
- [20] KUSHWAHA K, BABU D, JUNEJA VK. *Proteus*[M]// *Encyclopedia of Food Microbiology*. Oxford: Academic Press, 2014: 238-243.
- [21] KAVITAKE D, DEVI PB, DELATTRE C, REDDY GB, SHETTY PH. Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus: an overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 226: 111-120.
- [22] GIRAFFA G. Lactic acid bacteria: enterococcus in milk and dairy products[M]//*Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)*. Oxford: Academic Press, 2022: 151-159.
- [23] BAI J, XU DM, XIE DM, WANG MS, LI ZQ, GUO XS. 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.
- [24] 刘巧云. 干香菇中嗜淀粉芽孢杆菌耐热性的研究[J]. *食品安全导刊*, 2024, (13): 47-50.
- [25] DRIEHUIS F. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review[J]. *Agricultural and Food Science*, 2013, 22: 16-34.
- [26] SILVA VP, PEREIRA OG, LEANDRO ES, da SILVA TC, RIBEIRO KG, MANTOVANI HC, SANTOS SA. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 1895-1902.
- [27] WANG SR, LI JF, ZHAO J, DONG ZH, DONG D, SHAO T. Silage fermentation characteristics and microbial diversity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in response to exogenous microbiota from temperate grasses[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(12): 204.
- [28] ROOKE J, HATFIELD R. *Biochemistry of ensiling*[M]// *Silage Science and Technology*. vol. 42. Madison: American Society of Agronomy, 2003: 95-139.
- [29] 宋丽丽, 张雪, 张更新, 魏鑫丽, 王先平. 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.) 蛋白质组学研究中三种蛋白提取方法的比较分析[J]. *微生物学报*, 2024, 64(2): 623-632.
- SONG LL, ZHANG X, ZHANG GX, WEI XL, WANG XP. Comparison of three protein extraction methods for the proteomics research on *Paenibacillus* sp.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 623-632 (in Chinese).
- [30] BORREANI G, DOLCI P, TABACCO E, COCOLIN L. Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *Paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(8): 5206-5216.
- [31] BORREANI G, FERRERO F, NUCERA D, CASALE M, PIANO S, TABACCO E. Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(9): 8273-8289.
- [32] GUO FJ, MA Y, XU HM, WANG XH, CHI ZM. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(4): 737-746.
- [33] ORSI RB, CORRÊA B, POSSI CR, SCHAMMASS EA, NOGUEIRA JR, DIAS SMC, MALOZZI MAB. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2000, 36(1): 75-87.
- [34] BOYSEN ME, BJÖRNEHOLM S, SCHNÜRER J. Effect of the biocontrol yeast *Pichia Anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum*, and *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 19(2): 173-179.
- [35] MULLAN WMA. STARTER CULTURES. | Importance of Selected Genera[M]//*Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 2014: 515-521.
- [36] De NIJS M. Mycotoxins[M]//*Encyclopedia of Food Microbiology*. Oxford: Academic Press, 1999: 1520-1526.
- [37] ALONSO VA, PEREYRA CM, KELLER LAM, DALCERO AM, ROSA CAR, CHIACCHIERA SM, CAVAGLIERI LR. Fungi and mycotoxins in silage: an overview[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(3): 637-643.