

乳酸菌复合系和植物乳杆菌提高柳枝稷青贮效果

刘晶晶¹, 高丽娟², 师建芳³, 王小芬^{1*}, 袁旭峰¹, 崔宗均¹

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心, 北京 100193; 2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100089; 3. 农业部规划设计研究院农产品加工工程研究所, 北京 100125)

摘要: 该文旨在探讨接种乳酸菌复合系 SGL 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 对柳枝稷青贮效果的影响。以营养生长期阶段的柳枝稷为原料, 分别接种 1 OD₆₀₀/kg 鲜质量的 SGL 和 *Lactobacillus Plantarum*, 以不接菌的处理作为对照。在发酵第 3、10、20 和 30 天开罐取样进行检测分析发酵饲料品质, 通过短期人工瘤胃技术测定体外瘤胃发酵参数的变化, 并运用高通量测序技术分析原料和青贮料的细菌多样性。结果表明: 接种乳酸菌复合系 SGL 和 *Lactobacillus Plantarum* 均能有效抑制 *Enterobacter* 和 *Clostridium*, 使 *Lactobacillus* 成为控制发酵的优势菌, 加快青贮过程中 pH 值的下降速率, 提高柳枝稷青贮饲料品质, 并提高柳枝稷青贮料的瘤胃发酵效果, 复合菌系 SGL 比纯培养的 *Lactobacillus Plantarum* 的效果更突出。

关键词: 菌; 发酵; 微生物; 乳酸菌复合系; 植物乳杆菌; 柳枝稷; 青贮; 瘤胃发酵

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.09.044

中图分类号: X712

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-09-0295-08

刘晶晶, 高丽娟, 师建芳, 等. 乳酸菌复合系和植物乳杆菌提高柳枝稷青贮效果[J]. 农业工程学报, 2015, 31(9): 295—302.

Liu Jingjing, Gao Lijuan, Shi Jianfang, et al. Lactic acid bacteria community and *Lactobacillus Plantarum* improving silaging effect of switchgrass[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(9): 295—302. (in Chinese with English abstract)

0 引言

柳枝稷 (*Panicum virgatum*, L.) 是一种多年生禾本科暖季型牧草, 具有极强的抗逆性, 一年刈割 2 次 (孕穗后期和霜冻) 产量可达 12.2~21.0 t/hm²[1-2]。其整株植株的淀粉和蛋白质含量分别高于玉米 *Zeamays* 和大豆 *Glycinamax*^[3], 具有优良牧草的特性。柳枝稷在 6~8 月生长旺盛, 在美国中部和东部地区常作为冷季节放牧和干草的补充。

近年来, 中国畜牧业迅猛发展的同时, 饲料资源短缺和人畜争粮的矛盾等问题日益突出。为了保证畜牧业可持续发展, 改变畜牧业结构、推动耗粮型畜牧业向节粮型畜牧业转变势在必行。种草养畜尤其是用优质牧草来饲养家畜对中国畜牧业发展具有重要意义^[4]。柳枝稷作为一种高产优质禾本科牧草, 蕴藏着巨大的生产潜能。

青贮是牧草保藏的理想措施, 发酵品质好的青贮料的 pH 值为 3.5~4.5^[5]。C4 类型的牧草可溶性糖含量低, 青贮容易失败^[6]。直接青贮柳枝稷的营养成分虽然可以得

到很好的保存, 但 pH 值仅能降至 4.7~5.1^[7]。许多研究表明, 向青贮料中添加足量的乳酸菌, 可加速 pH 值降低, 有效地抑制梭菌的活动, 保证青贮饲料的安全和质量。目前, 有关添加乳酸菌对柳枝稷青贮发酵品质的报道较少, 现有的研究中使用的菌剂只有 *Lactobacillus Plantarum*^[8-9]。*Lactobacillus Plantarum* 是经常在青贮料中检测到的同型发酵乳杆菌, 是常用的青贮饲料添加剂。乳酸菌复合系由多种具有相互协同作用关系的菌株组成, 稳定高效, 近年来被广泛应用于苜蓿、秸秆、甘蔗渣和木薯渣等饲料的青贮或微贮接种剂^[10-13]。本实验室通过连续的限制性培养方法^[14]从柳枝稷青贮料中筛选到一组乳酸菌复合系 SGL, 该复合系组成稳定、发酵葡萄糖产生大量乳酸, 该复合系是否能柳枝稷柳枝稷青贮效果尚未有报道。本试验系统地研究了乳酸菌复合系 SGL 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus Plantarum*) 对柳枝稷的青贮发酵品质、微生物多样性和人工瘤胃发酵的影响, 从而为柳枝稷青贮饲料的开发和应用, 以及乳酸菌作为柳枝稷青贮接种剂的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

青贮原料: 2014 年 6 月中旬营养生长期收割的柳枝稷, 留茬高度 10~15 cm, 品种为低地型, 种植地为中国农业大学上庄实验站牧草种质繁育区。

接种剂及其培养: 菌种选用于来源于日本菌株收藏库 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) 的

收稿日期: 2015-03-20 修订日期: 2015-04-21

基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目 (2012BAD14B01); 新世纪优秀人才支持计划 (2014FG039)

作者简介: 刘晶晶, 女 (汉族), 山东滨州人, 博士生, 主要从事生物发酵饲料和微生态制剂方面的研究。北京 中国农业大学农学与生物技术学院, 100193。Email: liujing85@cau.edu.cn

*通信作者: 王小芬, 副教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源转化与利用研究。北京 中国农业大学农学与生物技术学院, 100193。

Email: wxiaofen@cau.edu.cn。

Lactobacillus Plantarum 和本实验室从柳枝稷青贮料中筛选的乳酸菌复合系 SGL, 主要由 *Lactobacillus Nantensis* (78.78%)、*Lactobacillus Plantarum* (7.92%)、*Lactobacillus Pantheris* (5.27%)、*Bacillus Coagulans* (4.41%) 和 *Lactococcus Lactics* (3.31%) 组成。用 MRS 培养液(蔗糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 乙酸钠 5 g/L, 柠檬酸铵 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L, 吐温 80 1.0 mL/L, pH 值调至 6.2~6.4, 115℃灭菌 20 min) 厌氧静置培养 24 h, 8 000 r/min 离心后取沉淀, 加入适量的去离子水, 使菌体浓度达到 $1 OD_{600}/mL$ ($1 OD_{600} > 10^{10} CFU$)。

1.2 青贮试验方法

本试验设置 3 个处理组, 处理 1 (用 CK 表示) 为对照组, 不接种乳酸菌; 处理 2 (用 SGL 表示) 接种乳酸菌复合系 SGL; 处理 3 (用 LP 表示) 接种植物乳杆菌 (*Lactobacillus Plantarum*)。柳枝稷收割后立即切碎成 1~2 cm 长, 不经萎蔫直接青贮。把接种剂溶于 10 mL 去离子水, 均匀喷洒在粉碎的原料上, 接种量为 $1 OD_{600}/kg$ 鲜质量。对照组加等量的去离子水, 称取 1 500 g 立即填装于 2 L 的塑料罐中, 压实密封后于 25~30℃避光保存。

对青贮原料测定营养成分、pH 值和微生物组成。在青贮第 3、10、20 和 30 天分别开罐取样检测 pH 值, 每个时间点 3 个重复。分析发酵 30 d 青贮料的可溶性碳水化合物、乳酸、挥发性脂肪酸、 NH_3-N 、营养成分、干物质回收率和干物质体外消化率。

1.3 测定方法

1.3.1 青贮饲料品质和有氧稳定性的测定

取 5.00 g 样品, 加入 45 mL Ringger' solution (氯化钠 9.0 g, 氯化钾 0.12 g, 氯化钙 0.24 g, 碳酸氢钠 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL), 放摇床上 200 r/min、10 min, 用双层纱布过滤后分装到无菌管中, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液用来测定 pH 值、水溶性碳水化合物和挥发性脂肪酸, 沉淀-20℃保存用于 DNA 的提取。

pH 值的测定使用 Compact pH Meter (model B-212, HORIBA, Japan) 微量 pH 计。水溶性碳水化合物的测定使用蒽酮比色法^[15]。挥发性脂肪酸的测定采用液相色谱法 (LC-20A, Shimadzu, Japan), 参照马旭光等使用的方法^[16], 上清液过 $0.22 \mu m$ 滤膜。分析柱为 Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm, Bio-Rad Company, USA)。流动相为 $0.005 mol/L H_2SO_4$ (pH 值=2.2), 流速为 0.6 mL/min, 柱温箱和进样温度分别为 40 和 90℃, 柱压为 1.3 MPa, 进样量为 $20 \mu L$ 。

样品干物质的测定使用国标法, 具体方法参照王月萍等^[17]。用于化学指标和青贮发酵指标的样品经 60℃、48 h 烘干, 粉碎, 过 40 目筛。纤维素、半纤维素含量测定使用酸碱洗涤法^[18], 准确称取粉碎后的样品 0.5 g, 装入 F57 专用袋中, 使用 ANKOM220 型纤维分析仪 (北京和众视野科技有限公司, 北京) 测定, 获得中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF) 和酸性洗涤木质素 (acid detergent

lignin, ADL) 的含量。将经酸碱洗涤后的样品至于干燥的坩埚中, 550℃烧 3 h, 冷却后称质量, 获得灰分含量。纤维素含量=NDF 含量-ADF 含量, 半纤维素含量=ADF 含量-ADL 含量, 木质素含量=ADL 含量-灰分含量。粗蛋白的计算使用 $N \times 6.25$, N 的测定采用凯氏定氮法^[19]。 NH_3-N 的测定使用连续流动化学分析仪 (AA3, Bran Lubbe, 德国)。

干物质回收率 (dry matter recovery, DMR) 的测定: 青贮结束后, 开封打开密封盖排气后称质量并记录。DMR (%) = [(开封时回收青贮质量×青贮 DM%) / (装填时装入原料质量×原料 DM%)] × 100。

青贮饲料的质量评定参照郭庭双^[5]所述的实验室评定方法。

有氧稳定性的测定方法参照 Hu W 等所述^[20]。取 400 g (鲜质量) 青贮料置于有盖的聚乙烯泡沫盒 (12 cm × 20 cm × 13 cm) 中, 不压实、不密封, 25℃恒温放置。测定青贮饲料在空气中暴露后其核心温度比外界温度高出 2℃所需要的小时数。温度的测定使用热电偶原理, 采用 YOKOGAWA DX1006 无纸记录仪, 分别将各热电偶置于秸秆中心处, 每 30 min 自动记录 1 次。

1.3.2 人工瘤胃发酵试验

选用 3 头健康、体质量约 450 kg 的西门塔尔肉牛作为试验用瘤胃液供体动物。试验期间饲喂的饲料包括玉米、豆粕、羊草、小苏打、食盐、矿物质舔块, 早上 08:30 下午 5:00 自由饮水。在早晨饲喂前 (07:30) 使用真空泵和预热 39℃的抽滤瓶 (1 000 mL) 抽取瘤胃液, 用 4 层纱布过滤。采用 Tilley 和 Terry 的 2 阶段法中的第一阶段与瘤胃液一起发酵 48 h^[21], 模拟饲料在瘤胃的消化。准确称取 0.50 g 的样品装入特制的无纺布小袋 (孔径 35~45 μm , 中国农业大学肉牛研究中心专利产品) 中, 放入盛有 70 mL 混合培养液 (瘤胃液与缓冲液配比为 1:1) 的 100 mL 的玻璃培养管中。通入 CO_2 后迅速盖好橡胶盖, 放入 39℃恒温水浴箱中培养 48 h。每个样品需 3 个重复, 不加样品的过滤袋作为空白。发酵开始 6 h 内每小时摇动 1 次, 以后每 2 h 摇动 1 次, 12 h 后每 4 h 摇动 1 次。发酵 48 h 后取出过滤袋, 立即测定发酵液的 pH 值。过滤袋迅速用冷水冲洗, 105℃烘干 12 h, 称量和计算样品干物质消化率。并立刻将瘤胃液 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定瘤胃液 NH_3-N 浓度和挥发性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA) 浓度。 NH_3-N 浓度的测定使用苯酚-次氯酸钠比色法^[22], VFA 的测定使用气相色谱法^[23]。

1.3.3 DNA 提取和 Miseq 高通量测序

样品总 DNA 的提取使用 Murray 和 Thompson 拟定的 CTAB 法^[24]。将样品 DNA 送至上海美吉生物医药科技有限公司 (Majorbio Co., Ltd., China) 进行 Miseq 测序和后期数据分析。PCR 扩增区域为 16S rRNA 的 V4 和 V5 区, 使用的引物是 515F (5' -GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 907R (5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')。具体方法同 Hai 等所述^[25]。

1.4 统计分析

试验数据用 SPSS Statistics 软件 (SPSS STATISTICS

V17.0, SPSS Inc., USA), 在 $P=0.05$ 水平上进行差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 青贮原料的营养成分和微生物组成

体外干物质消化率、粗蛋白、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维等是评价牧草营养价值的重要指标。优质牧草具有较高的体外干物质消化率和粗蛋白含量, 粗蛋白质量分数低于 7% 不利于牧草在瘤胃发酵, 不能满足动物生长需求^[26]。Guretzky 等^[2]指出柳枝稷高质量牧草利用季节应选择其营养生长阶段。本试验所用柳枝稷于 6 月中旬收割, 正处在其营养生长阶段, 化学成分含量如表 1 所示。粗蛋白(crude protein, CP)、水溶性碳水化合物(water soluble carbohydrate, WSC)、中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)质量分数分别为 8.57%、4.07%、69.08%和 36.92%。Seal 等^[27]发现, 原料中水溶性糖浓度是影响青贮品质的限制因子之一, 如果青贮原料中糖分不足, 乳酸菌不能迅速繁殖, 乳酸量不足, 导致厌氧的腐败菌大量繁殖, 导致青贮失败。Yang 等^[28]指出起始 WSC 质量分数 6.0%~7.0% 是青贮过程中 pH 值能否有效下降的分界线。本试验所用青贮原料粗蛋白含量较高, 但水溶性碳水化合物质量分数仅为 4.07%, 青贮容易失败。

表 1 青贮原料的干物质和化学成分含量
Table 1 Chemical composition of switchgrass before ensiling (dry matter basis)

成分 Composition	质量分数 Content/%
干物质 Dry matter	26.43±0.38
pH 值 pH value	6.4±0.1
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	69.08±0.20
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	36.92±0.39
纤维素 Cellulose	33.47±0.19
半纤维素 Hemicellulose	32.16±0.60
木质素 Lignin	3.44±0.99
粗蛋白 Crude protein	8.57±0.29
铵态氮 NH ₃ -N	0.02±0.00
可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate	4.07±0.01
干物质消化率 In vitro dry matter digestibility	54.22±2.24

原料中乳酸菌数量和种类是影响青贮品质的另一限制因子。青饲饲料收割后本身带有一定的乳酸菌数量, 同时也带有与乳酸菌形成竞争的有害菌。如表 2 所示, 本试验所用青贮原料中的主要微生物类群为葡萄球菌属 *Staphylococcus* (68.53%)、肠杆菌属 *Enterobacter* (15.23%)、泛菌属 *Pantoea* (6.59%)、蓝藻细菌 *Cyanobacteria norank* (4.62%) 和微小杆菌属 *Exiguobacterium* (1.86%) 等不利于青贮的兼性厌氧或好氧菌, 而促进 pH 值降低的肠球菌属 *Enterococc* 和乳杆菌属 *Lactobacillus* 相对丰度很低, 仅为 0.1% 和 0.08%。因此, 添加乳酸菌剂、增加原料中乳酸菌数量, 对促进乳酸发酵、提高柳枝稷青贮饲料品质具有重要意义。

表 2 青贮原料的微生物组成多样性及各菌的相对丰度(属水平)
Table 2 Microbial community diversity and relative abundance in switchgrass before ensiling

微生物 Microbial community	相对丰度 Relative abundance/%
<i>Staphylococcus</i>	68.53
<i>Enterobacter</i>	15.23
<i>Pantoea</i>	6.59
<i>Cyanobacteria_norank</i>	4.62
<i>Exiguobacterium</i>	1.86
<i>Enterococcus</i>	0.10
<i>Lactobacillus</i>	0.08
<i>Serratia</i>	0.06
<i>Aerococcus</i>	0.03
其他 Others	2.91

2.2 接种乳酸菌剂对柳枝稷青贮发酵品质的影响

2.2.1 青贮发酵特性

pH 值是评定青贮发酵品质的重要指标, 不同处理的柳枝稷发酵过程中 pH 值的动态变化如图 1 所示。从图中可以看出, 未接种的柳枝稷发酵初期(0~3 d) pH 值先升高, 之后缓慢下降。而接种 SGL 和 *Lactobacillus Plantarum* 的柳枝稷发酵初期 pH 值都迅速下降, 但 LP 的下降速率相对 SGL 的缓慢。pH 值的快速降低能够抑制不利于青贮的厌氧微生物如肠细菌和梭菌的生长, 减少蛋白质等营养成分的损失^[29]。高的 pH 值(>4.5)是发酵失败的标志之一^[30]。发酵 30 d 后, SGL 的 pH 值降至 4.5, 而对照和 LP 的 pH 值大于 4.5, 分别为 5.3 和 4.9。结果表明, 添加乳酸菌剂 SGL 和 *Lactobacillus Plantarum* 有利于柳枝稷青贮过程中 pH 值的下降, 但 SGL 的下降速率比 LP 快, 并且最终发酵 pH 值也低于 LP。这说明, 添加乳酸菌复合系 SGL 的柳枝稷青贮效果优于纯培养的单一菌株 *Lactobacillus Plantarum*。但按照 pH 值与青贮质量的关系来评定柳枝稷青贮质量, 对照的青贮质量差, 接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌使柳枝稷青贮质量有所改善, 但均未达到优等水平。

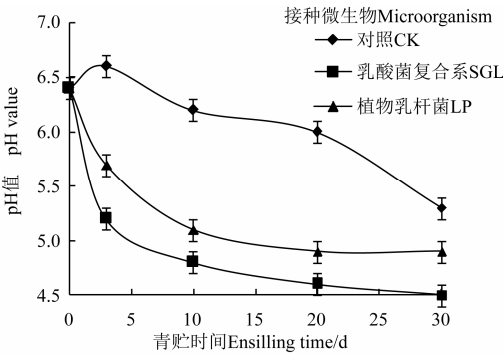


图 1 柳枝稷青贮过程中 pH 值动态变化
Fig.1 Changes in pH value of switchgrass during fermentation

青贮料中有机酸的种类和浓度可以反映青贮发酵过程的好坏以及青贮料的有氧稳定性, 其中最重要的是乙酸、丁酸和乳酸。乳酸有利于 pH 值的降低, 可以减少发酵过程中干物质的损失, 却又是酵母菌等真菌利用的基

质，会降低青贮料的有氧稳定性；乙酸可以有效抑制酵母菌的生长，被认为是抑制酵母等真菌生长的主要物质，能提高青贮料的有氧稳定性^[31]。丁酸和 NH₃-N 是分别是梭菌等不良微生物分解青贮料中的糖或乳酸和蛋白质或氨基酸等而成，使青贮饲料具有恶臭，降低青贮品质，影响饲料采食量，因此越少越好。有氧稳定性为青贮饲料在空气中暴露后其核心温度比外界温度高出 2℃所需要的小时数，该时间越短，青贮有氧稳定性越差。

添加乳酸菌对柳枝稷青贮发酵产物和有氧稳定性的影响见表 3。如表 3 所示，添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均能使乳酸/乙酸比例上升。Weinberg 等^[32]发现同型发酵乳酸菌会降低青贮料的有氧稳定性。本试验中，*Lactobacillus Plantarum* 和乳酸菌复合系 SGL 中的主要菌种均为同型发酵乳酸菌。与 Weinberg 等的研究结果一致，添加复合系和植物乳杆菌降低了柳枝稷青贮料的有氧稳定性。

添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均降低了青贮料中铵态氮的浓度，分别比对照减少了 61.43%和 50%，SGL 和 LP 差异显著 ($P<0.05$)。说明，添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均能有效抑制蛋白质的分解，但前者的效果优于后者。

添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均能增加乳酸含量，分别比对照增加了 3.03 倍和 2.71 倍，复合系和植物乳杆菌之间差异不显著。添加复合系和植物乳杆菌均能降低丁酸含量，SGL 未检测到，LP 比对照减少了 86.71%。以有机酸含量来评估柳枝稷青贮质量，对照中乙酸和丁酸含量高，乳酸含量低，青贮质量差；LP 和 SGL 中乳酸所占比例虽然提高，但乙酸所占比例仍然偏高，青贮质量虽有改善，但均未达到优等水平。

综上所述，添加复合系和植物乳杆菌改善了柳枝稷青贮饲料品质，但未使其达到优等水平。SGL 中的丁酸和铵态氮含量均显著低于 LP，说明柳枝稷青贮中添加乳酸菌复合系对有害发酵的抑制效果更显著。

2.2.2 青贮饲料营养成分

粗蛋白(crude protein, CP)、水溶性碳水化合物(water soluble carbohydrate, WSC)和干物质(dry matter, DM)含量综合了青贮饲料中碳水化合物和蛋白质发酵两方面的信息，是评定青贮饲料发酵品质的重要指标，青贮后 CP、WSC、DM 含量越高，营养物质的损失越少，发酵品质越好。发酵 30 d 后，柳枝稷青贮料的营养成分和干物质回收率如表 3 所示。

表 3 发酵 30 d 柳枝稷青贮料的发酵特性
Table 3 Fermentation characteristics of switchgrass silages for 30 d

处理 Treatment	乳酸 Lactic acid/%	乙酸 Acetic acid/%	丁酸 Butyric acid/%	乳酸/乙酸 Lactic acid/Acetic acid	铵态氮 NH ₃ -N/%	有氧稳定性 Aerobic stability/h
对照 CK	0.38±0.06a	3.38±0.02a	2.86±0.46a	0.11	0.70±0.01a	721±11a
乳酸菌复合系 SGL	1.53±0.49b	3.37±0.03a	0.00±0.00b	0.45	0.24±0.01b	665±20b
植物乳杆菌 LP	1.41±0.06b	2.90±0.02b	0.38±0.01c	0.49	0.35±0.02c	651±17b

注：数据后的字母表示不同样品之间同一物质含量差异显著 ($P<0.05$)。表中数据均以干基计。下同。
Note: Different letters following numbers mean in rows with unlike superscripts differ ($P<0.05$). Data was based on dry matter of the silage. The same as below.

接种同型发酵乳酸菌可以减少青贮过程中干物质的损失^[33]。如表 4 所示，发酵 30 d 后，CK、SGL 和 LP 的干物质含量均低于青贮前 ($P<0.05$)，但 SGL 和 LP 高于对照 ($P<0.05$)。同时，SGL 和 LP 的干物质回收率分别比 CK 提高了 6.87%和 7.50%，SGL 和 LP 差异不显著 ($P>0.05$)。复合系 SGL 中的主要组成菌种和 *Lactobacillus Plantarum* 均为同型发酵乳酸菌，本研究与前人研究结果一致。

如表 4 所示，各处理之间 NDF 含量没有显著差异，

但 SGL 的 ADF 和半纤维素含量显著低于 CK，纤维素含量显著高于 CK。这说明，接种 SGL 青贮可以显著降低柳枝稷的 ADF 和半纤维素含量，可能是由于在发酵过程中其所包含的微生物能产生分解粗纤维的酶，其机理尚需进一步研究。直接青贮使原料 CP 含量下降，接种 LP 和 SGL 使 CP 含量增加。CK 的 pH 值在 5.0 以上，肠杆菌和梭菌等腐败菌生长不受抑制，将粗蛋白分解成氨，影响青贮质量。因此，直接青贮柳枝稷不易得到优质的青贮饲料。

表 4 发酵 30 d 柳枝稷青贮料的营养成分和干物质回收率
Table 4 Chemical composition and DMR of silages for 30 d

	干物质 Dry matter	粗蛋白 Crude protein	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	纤维素 Cellulose	半纤维素 Hemicellulose	水溶性碳水化 合物 Water soluble carbohydrate	干物质回收 Dry matter recovery	干物质消化率 In vitro dry matter digestibility
对照 CK	24.68±0.11a	7.42±0.93a	69.91±0.95a	38.10±0.29a	31.81±0.25a	34.55±0.31a	1.26±0.08a	90.26±0.54a	47.6±0.19a
乳酸菌复合系 SGL	25.79±0.72b	9.08±0.31b	70.82±0.98a	36.83±0.22b	33.99±0.49b	32.77±0.77b	0.80±0.04b	96.46±0.30b	53.90±0.63b
植物乳杆菌 LP	25.10±0.28b	8.63±0.41c	68.01±0.48a	37.48±0.53ab	30.53±0.05a	34.03±0.14a	1.10±0.12c	97.03±1.12b	49.17±0.85c

乳酸菌接种剂被用来提高青贮效率，是因为它们可以有效利用原料中的 WSC 生成乳酸，降低 pH 值^[34]。SGL 和 LP 中残留 WSC 含量显著低于 CK，而 SGL 显著低于 LP，说明 SGL 对原料中 WSC 的利用率比 *Lactobacillus*

Plantarum 高。接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌可以增加 CP 含量，分别比对照增加了 22.37%和 16.31%，SGL 显著高于 LP。

Weinberg^[35]发现 *Lactobacillus Plantarum* 等乳酸菌接

种剂具有提高青贮饲料干物质消化率（*In vitro* dry matter digestibility, IVDMD）的潜力。本试验中，CK、SGL 和 LP 处理的青贮料的 IVDMD 均比原料（54.22%）低，但 SGL 和 LP 分别比 CK 高 13.24%和 3.30%，SGL 显著高于 LP（ $P<0.05$ ）。这说明，直接青贮会降低原料的 IVDMD，但青贮前添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可以提高青贮料的 IVDMD，并且前者的效果优于后者。

2.3 青贮料微生物组成和多样性

运用 PCR 方法扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4 和 V5 区进行高通量测序，对青贮前原料（untreated, UT）和青贮料（对照 CK、乳酸菌复合系 SGL 和植物乳杆菌 LP）进行细菌多样性分析，优化后分别获得 11 446、15 056、12 899 和 17 316 条有效序列，测序覆盖深度（coverage 指数）均达到 0.999，说明本次测序结果能代表样本的真实情况。经过 97%相似度归并后分别得到 26、44、31 和 24 个操作分类单元（operational taxonomic units, OTUs），多样性指数如表 5 所示。经多样性分析，菌群丰度由小到依次为大依次为 SGL<UT<LP<CK，这说明，直接青贮或

接种 *Lactobacillus Plantarum* 青贮会增加原料中微生物物种数目，但接种复合系 SGL 青贮会减少微生物物种数目。不同处理之间 Simpson 和 Shannon 值不同，UT、CK、LP 和 SGL 的 Simpson 值分别为 0.4998、0.3757、0.1319 和 0.4618，Shannon 值分别为 1.12、1.44、2.25 和 1.18，微生物多样性从低到高依次为 UT<SGL<CK<LP，表明青贮会增加原料中微生物群落多样性，接种复合菌系高于对照和接种植物乳杆菌（*Lactobacillus Plantarum*）的青贮料。各处理之间菌群丰度和群落多样性的排序不同，说明 SGL 中微生物各物种之间个体分配的均匀性高于 UT，LP 的均匀性高于 CK，接种乳酸菌可以增加青贮料中各物种之间个体分配的均匀性。一般细菌适宜生长的 pH 值条件一般在 4.4 以上，若低于该值，细菌的生长速率将大大降低甚至死亡。本试验中，SGL 的处理在青贮过程中 pH 值迅速下降，最终降至 4.5，抑制了一些细菌的生长，故而菌群丰度降低。而 LP 和 CK 的处理 pH 值下降缓慢，最终 pH 值大于 4.5，一些厌氧的细菌仍能生长，因此微生物数目增加。

表 5 原料和青贮料的菌群多样性分析指数

Table 5 Community richness estimators of raw materials and silages of switchgrass

样品名 Sample ID	序列数 Reads	OTU	Ace (lci, hci)	Chao (lci, hci)	Coverage	Shannon (lci, hci)	Simpson (lci, hci)
原料 UT	11 446	26	28 (26,39)	28 (26,38)	0.999651	1.12 (1.10,1.14)	0.4998 (0.4897,0.5098)
对照 CK	15 056	44	53 (47,76)	53 (46,84)	0.999402	1.44 (1.41,1.46)	0.3757 (0.3696,0.3819)
植物乳杆菌 LP	12 899	31	33 (31,42)	33 (31,46)	0.999767	2.25 (2.24,2.27)	0.1319 (0.1298,0.134)
乳酸菌复合系 SGL	17 316	24	32 (26,50)	26 (24,40)	0.999769	1.18 (1.16,1.19)	0.4618 (0.4542,0.4694)

注：lci, hci 分别表示统计学中的上限值和下限值。OTU：分类单元。Chao 和 Ace 是估计群落中含 OTU 数目的指数，二者算法不同；Simpson 和 Shannon 是估算样品中微生物的多样性指数。
Note: lci and hci mean upper limit and lower limit in statistics, respectively. OUT: operational taxonomic unit; Chao and Ace were the indexes of OUT no. by different algorithms, Simpson and Shannon were the indexes for evaluating the microbial diversity.

不同处理柳枝稷青贮料的微生物组成如图 2 所示。柳枝稷青贮料中的细菌群落的种类主要包括乳杆菌属 *Lactobacillus*、肠杆菌属 *Enterobacter*、肠球菌属 *Enterococcus*、梭菌属 *Clostridium*、气球菌属 *Aerococcus*、芽孢乳杆菌属 *Sporolactobacillus*、毛螺菌属 *Lachnospira*、瘤胃球菌数 *Ruminococcaceae*、魏斯氏菌属 *Weissella*、泛菌属 *Pantoea*、沙雷氏菌属 *Serratia* 等。如表 2 所示，原料中的优势种是葡萄球菌属 *Staphylococcus*（68.53%），但青贮后的 3 个处理中均未发现该菌，这说明青贮较低的 pH 值可以抑制 *Staphylococcus* 的繁殖。

优质的青贮料中乳酸菌是优势种，肠杆菌和梭菌等腐败菌数量较少。本试验中，不同处理之间微生物的组成及各菌的相对多度差异显著。CK 中的优势种为肠杆菌属 *Enterobacter*（53.60%），其次是肠球菌属 *Enterococcus*（29.08%）。SGL 和 LP 中的优势种均为 *Lactobacillus*，分别为 77.06%和 36.88%，SGL 显著高于 LP，接种乳酸菌后，青贮料中的 *Enterobacter* 的相对多度显著降低，LP 和 SGL 分别为 16.76%和 13.71%，但 *Clostridium* 的相对多度升高，CK、LP 和 SGL 分别为 1.11%、2.03%和 12.09%，并且 LP 显著高于 SGL。

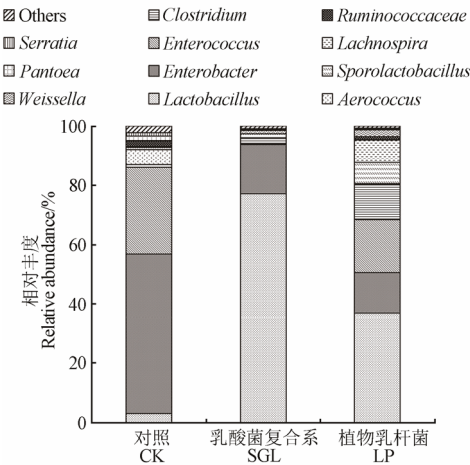


图 2 不同处理柳枝稷青贮料的微生物组成（属水平）

Fig.2 Microbial community structure by pyrosequencing of 16S rRNA genes in switchgrass forages (genus level)

结果说明，接种复合菌系和植物乳杆菌均可以使乳杆菌属成为控制发酵的优势菌，并且前者的效果优于后者；有效抑制大肠杆菌的生长，但对梭菌无效。本试验中所用乳酸菌复合系 SGL 是以柳枝稷青贮料为菌源筛选的，一方面更能适应柳枝稷青贮条件，迅速繁殖，成为

控制发酵的优势菌；另一方面，复合系由多种菌组成，其抑菌范围比单菌更广，抑菌强度比单菌更大，从而使其对青贮过程中有害菌的抑制效果更好。尽管 SGL 中乳酸菌的相对丰度高于 LP，但二者的乳酸含量并没有显著差异，具体原因尚需做进一步研究。LP 中丁酸和铵态氮

浓度均高于 SGL，可能与其中梭菌的相对丰度高有关。

2.4 SGL 对柳枝稷青贮饲料瘤胃发酵参数的影响

瘤胃液 pH 值、挥发性脂肪酸和铵态氮是衡量瘤胃生理状况的重要指标，主要受饲料成分的影响。各处理的瘤胃发酵参数如表 6 所示。

表 6 不同处理对体外瘤胃发酵参数的影响

Table 6 Effects of proportion of different treatments on in vitro ruminal fermentation parameters

处理 Treatment	pH 值 pH value	铵态氮 NH ₃ -N/ (mg·100mL ⁻¹)	乙酸 Acetic acid/(mmol·L ⁻¹)	丙酸 Propionic acid/(mmol·L ⁻¹)	丁酸 Butyric acid/(mmol·L ⁻¹)	总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acid/ (mmol·L ⁻¹)	乙酸/丙酸 Acetic acid/ Propionic acid
原料 UT	7.10±0.1	31.52±0.49a	43.29±0.77a	19.04±0.49a	8.16±0.11a	70.49±3.03a	2.27
对照 CK	7.10±0.1	27.15±0.12b	40.87±0.14b	15.55±0.21b	7.01±0.25b	63.43±1.95b	2.63
乳酸菌复合系 SGL	7.10±0.1	34.50±0.13c	46.39±0.01c	16.28±0.52c	7.76±0.21c	70.43±0.77a	2.85
植物乳杆菌 LP	7.10±0.1	30.33±1.62a	45.25±0.74c	16.24±0.94c	8.03±0.08d	69.51±0.18a	2.79

瘤胃 pH 值正常范围为 6~7，高粗料日粮可以提高瘤胃的 pH 值，瘤胃 pH 值升高有利于生成乙酸、提高乙酸和丙酸的比例^[38]。乙酸、丙酸和丁酸等挥发性脂肪酸是反刍动物重要的能量来源，正常情况下瘤胃中乙酸、丙酸、丁酸占总挥发性脂肪酸的比例分别为 50%~65%、18%~25%、12%~20%，乙酸/丙酸比值为 2.0~3.6 属正常范围，在此范围内，总挥发性脂肪酸浓度越高说明瘤胃发酵效果越好^[39]。本试验中，人工瘤胃发酵液 pH 值接近正常水平，不同处理之间无差异；乙酸、丙酸和丁酸占总挥发性脂肪酸的比例以及乙酸/丙酸均在正常范围内，其中 SGL 和 LP 显著高于对照，SGL 和 LP 的乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸含量均无显著差异 ($P>0.05$)。说明接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可以提高青贮料的瘤胃发酵效果，且二者之间差异不显著。

瘤胃液中铵态氮是饲料蛋白和菌体蛋白分解的最终产物，是瘤胃内合成菌体蛋白质的主要前体物质，其浓度高低反映饲料的能氮平衡并影响瘤胃微生物的活性，进而影响瘤胃发酵效率。微生物生长对 NH₃-N 浓度耐受的临界范围为 6.0~30.0 mg/100mL^[40]。如表 6 所示，CK、LP 和 UT 均在正常范围内，SGL 略高于临界范围，其中对照显著低于青贮前原料，接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌的 SGL 和 LP 显著高于对照。这说明，自然青贮会抑制了饲料蛋白质的分解，但接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌青贮促进了蛋白质的分解。饲料中的蛋白被分解为氨后，一部分被瘤胃壁吸收进入血液，一部分被微生物利用合成菌体蛋白，一部分在瘤胃液中存在。接种 SGL 青贮料的瘤胃液铵态氮浓度增加，可能是该处理促进了瘤胃中蛋白质的降解，使氨在瘤胃内聚集。

综上所述，青贮处理会影响柳枝稷在人工瘤胃中的发酵参数。瘤胃是一个复杂的微生态环境，大量的微生物类群在其中发挥着重要作用，青贮对柳枝稷人工瘤胃发酵参数的影响机制尚需做进一步研究。

3 结 论

1) 青贮前添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌可以有效抑制肠杆菌 (*Enterobacter*)，使 *Lactobacillus* 成为控制发酵的优势菌。前者的肠杆菌相对丰度略高于后者 (分

别为 16.76%和 13.71%)，但前者的乳杆菌相对丰度显著高于后者 (分别为 77.06%和 36.88%)。

2) 青贮前添加添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可降低柳枝稷青贮料的 pH 值，从 5.4 分别降至 4.5 和 4.9；乳酸含量分别比对照增加了 3.03 倍和 2.71 倍，复合系和植物乳杆菌之间差异不显著；前者未检测到丁酸，后者丁酸含量比对照减少了 86.71%；有效抑制蛋白质的分解，铵态氮的浓度分别比对照减少了 61.43%和 50%，前者显著低于后者 ($P<0.05$)。

3) 青贮前添加乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可提高干物质回收率 (分别比对照提高了 6.87%和 7.50%)，增加粗蛋白含量 (分别比对照增加了 22.37%和 16.31%)，显著提高青贮饲料的营养价值。

3) 接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可提高柳枝稷青贮料的瘤胃发酵效果，增加青贮料的体外干物质消化率 (分别增加了 13.24%和 3.30%)，提高总挥发性脂肪酸浓度和乙酸/丙酸比值，促进蛋白质的分解。

柳枝稷中水溶性碳水化合物含量和乳酸菌相对较低，青贮容易失败，接种乳酸菌复合系和植物乳杆菌均可以提高柳枝稷青贮效果和青贮料的人工瘤胃发酵效果。但以 pH 值和有机酸含量来评估柳枝稷青贮质量，接种乳酸菌复合系的处理比接种植物乳杆菌的处理质量好，但二者均未使青贮质量达到优等水平。因此，要使柳枝稷青贮质量达到优等水平，除了乳酸菌，还需添加其他发酵促进剂。

[参 考 文 献]

[1] Trócsányi Z K, Fieldsend A F, Wolf D D. Yield and canopy characteristics of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) as influenced by cutting management[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(3): 442—448.

[2] Guretzky J A, Biermacher J T, Cook B J, et al. Switchgrass for forage and bioenergy: harvest and nitrogen rate effects on biomass yields and nutrient composition[J]. Plant and Soil, 2011, 339(1/2): 69—81.

[3] 胡松梅, 龚泽修, 蒋道松. 生物能源植物柳枝稷简介[J]. 草业科学, 2008, 25(6): 29—33.

Hu Songmei, Gong Zexiu, Jiang Daosong. Brief introduction of

- a bio-energy crop-*Panicumvirgatum*[J]. Pratacultral Science, 2008, 25(6): 29—33. (in Chinese with English abstract)
- [4] 赵晓倩. 我国牧草供需现状分析及未来趋势预测[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
Zhao Xiaoqian. States and Forecast on Forage Supply and Demand in China[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [5] 郭庭双. 秸秆畜牧业[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994.
- [6] Pandithararne S, Allen V G, Fontenot J P, et al. Ensiling characteristics of tropical grasses as influenced by stage of growth, additives and chopping length[J]. Journal of Animal Science, 1986, 63(1): 197—207.
- [7] Burns J C, Fisher D S, Pond K R. Ensiling characteristics and utilization of switchgrass preserved as silage[J]. Postharvest Biology and Technology, 1993, 3(4): 349—359.
- [8] Masse D, Gilbert Y, Savoie P, et al. Methane yield from switchgrass and reed canarygrass grown in Eastern Canada[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10286—10292.
- [9] Masse D, Gilbert Y, Savoie P, et al. Methane yield from switchgrass harvested at different stages of development in Eastern Canada[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(24): 9536—9541.
- [10] Wang X, Haruta S, Wang P, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 57(1): 106—115.
- [11] Gao Lijuan, Yang Hongyan, Wang Xiaofen, et al. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 2742—2748.
- [12] 马静静, 王小芬, 程序, 等. 乳酸菌发酵使木薯淀粉残渣饲料化研究[J]. 农业工程学报, 2008(6): 267—272.
Ma Jingjing, Wang Xiaofen, Cheng Xu, et al. Fermentation of cassava residue by the lactic acid bacteria community SFC-2 for feed[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(6): 267—272. (in Chinese with English abstract)
- [13] 柳洪良, 具红光, 全炳武, 等. 乳酸菌对不同起始糖浓度甘蔗渣发酵品质的影响[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(2): 89—96.
Liu Hongliang, Ju Hongguang, Quan Bingwu, et al. Effects of lactic acid bacteria on fermentation characteristics of bagasse with different soluble sugar concentrations[J]. Journal of China Agricultral University, 2011, 16(2): 89—96. (in Chinese with English abstract)
- [14] 崔宗均, 王小芬. 一种筛选功能菌群的方法: 中国, CN102703321A[P]. 2012-10-03.
- [15] Thomas T A. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1977, 28(7): 639—642.
- [16] 马旭光, 刘晶晶, 郑泽慧, 等. 乙酸和乳酸对玉米秸秆青贮料有氧稳定性和甲烷产率的影响[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 44—52.
Ma Xuguang, Liu Jingjing, Zheng Zehui, et al. Effects of acetic acid and lactic acid in corn stover silage on aerobic stability and methane yield rate[J]. 2015, 20(1): 44—52. (in Chinese with English abstract)
- [17] 王月萍, 袁耀明, 刘仕军. 玉米青贮饲料干物质含量不同测定方法的比较研究[J]. 中国奶牛, 2009(12): 15—17.
Wang Yueping, Yuan Yaoming, Liu Shijun. Comparison of different analysis methods of corn silage dried matter[J]. China Dairy Cattle, 2009(12): 15—17. (in Chinese with English abstract)
- [18] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. Grass and Forage Science, 1991, 74(10): 3583—3597.
- [19] Helrich C K. Official methods of Analysis of the AOAC. Volume 2[M]. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [20] Hu W, Schmidt R J, McDonnell E E, et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(8): 3907—3914.
- [21] Tilley J M A, Terry R A. Two-Stage technique for The *in vitro* digestion of forage crops[J]. Grass & Forage Science, 2006, 18(2): 104—111.
- [22] 冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(6/7): 37.
- [23] 曹庆云, 周武艺, 朱贵钊, 等. 气相色谱测定羊瘤胃液中挥发性脂肪酸方法研究[J]. 中国饲料, 2006(24): 26—28.
- [24] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321—4325.
- [25] Hai R, Wang Y, Wang X, et al. Impacts of multiwalled carbon nanotubes on nutrient removal from wastewater and bacterial community structure in activated sludge[J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e107310—e107345.
- [26] Burns J C, Mochrie R D. Timothy. Steer performance from two perennial Pennisetum species, switchgrass, and a fescue—'Coastal' bermuda grass system[J]. Agronomy Journal, 1984, 76(5): 795—800.
- [27] Seal D R, Henderson A R, Pettersson K O, et al. The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of lucerne silage in laboratory silos[J]. Grass and Forage Science, 1986, 41(1): 61—70.
- [28] Yang Hongyan, Wang Xiaofen, Liu Jianbin, et al. Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(3): 232—237.
- [29] Te Giffel M C, Wagendorp A, Herrewegh A, et al. Bacterial spores in silage and raw milk[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81(1/2/3/4): 625—630.
- [30] Muck R E. Factors Influencing silage quality and their implications for management[J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(11): 2992—3002.
- [31] Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 562—567.
- [32] Weinberg Z G, Ashbel G, Yaira Hen, et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1993, 75(6): 512—518.
- [33] Muck R E, Kung L J. Effects of silage additives ensiling[M]// Silage: Field to Feedbun. Ithaca, NY, USA: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1997:187—199.
- [34] Weinberg Z G. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1996, 19(1): 53—68.

- [35] Weinberg Z G, Shatz O, Chen Y, et al. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(10): 4754—4762.
- [36] Wang Y, Sheng H F, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264—8271.
- [37] Kato S, Haruta S, Cui Z, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7099—7106.
- [38] 王庆丽, 田兰英, 赵仁义, 等. 影响奶牛瘤胃 pH 值的因素[J]. 河南畜牧兽医: 综合版, 2008, 29(19): 36—37.
- [39] 孙国强, 吕永艳, 蔡李逢, 等. 复合处理麦秸、青贮玉米秸和精料的组合及比例对奶牛体外瘤胃发酵的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(1): 69—76.
- Sun Guoqiang, Lu Yongyan, Cai Lifeng, et al. Effects of combinations and proportions of combination-treated wheat straw, maize straw silage and concentrate on rumen fermentation of dairy cows *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(1): 69—76. (in Chinese with English abstract)
- [40] Preston T R, Leng R A. Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics[M]. Armidale: Penambul Books, 1987.

Lactic acid bacteria community and *Lactobacillus Plantarum* improving silage effect of switchgrass

Liu Jingjing¹, Gao Lijuan², Shi Jianfang³, Wang Xiaofen^{1*}, Yuan Xufeng¹, Cui Zongjun¹

(1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University/Center of Biomass Engineering, China Agricultural University Beijing 100193, China; 2. Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing 100089, China; 3. China Institute of Agricultural Product Processing Engineering, Chinese Academy of Agricultural Engineering, Beijing 100125, China)

Abstract: Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) is a warm-season perennial bunchgrass, and the crude protein content of its whole plant is higher than the whole plant of soybean. It is a kind of excellent grass as a livestock feed, which not only has high yield and outstanding quality, but also shows very strong tolerance or resistance to the adverse environment. Lactic acid bacteria (LAB) are often added to forage crops for improving the silage fermentation at the ensiling period, and LAB community has been widely used to prepare the fermented feed, such as alfalfa, crop stalks, bagasse and manioc waste. However, few studies have been done about the effect of LAB on the characteristics of switchgrass silage. Considering the selectivity of inoculants, a stable LAB community named SGL was detected from switchgrass silage by continuous restricted subcultivation. The results of the pyrosequencing showed that the major components in the SGL were *Lactobacillus nantensis* (78.78%), *Lactobacillus plantarum* (7.92%), *Lactobacillus panthers* (5.27%), *Bacillus coagulans* (4.41%) and *Lactococcus lactic* (3.31%), of which *Lactobacillus plantarum* (LP) is one of the most frequently used LAB species. The present experiment was conducted to investigate the effects of the SGL community or a single component *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, microbial diversity and rumen fermentation of the resulting silage. Switchgrass was harvested by hand in mid-June when it was just in the vegetative growth stage (26.43% dry matter), and chopped to about 1.5 cm with a laboratory type chopper. The chopped forages were ensiled in 2 L anaerobic jars in the following treatments: control that is untreated, SGL and LP. SGL and LP were both applied in the same quantity of distilled water (10 mL solution per kg forage) at the dose of 1 OD₆₀₀/kg of fresh forage. The control also received 10 mL water per kg forage forage. Three jars per treatment were sampled on the 3rd, 10th, 20th and 30th day after ensiling, for chemical and microbiological analysis. At the end of the ensiling period, i.e. the 30th day, the silages were subjected to an artificial rumen fermentation and an aerobic stability test at 25°C. The results indicated that the inoculation with SGL and LP both improved the fermentation, promoted the decline of pH value, decreased the concentration of NH₃-N and butyrate acid, increased the concentration of lactic acid and crude protein in the silage, but decreased the concentration of acetic acid and reduced the aerobic stability. The 16S rRNA gene-based pyrosequencing was used to analyze the community of the resulting silage, and the results indicated that the diversity of microorganisms among different treatments had significant difference ($P < 0.05$). *Lactobacillus* was the advantageous species, and *Enterobacter* were inhibited effectively in both SGL and LP. Rumen fermentation characteristics were determined by 48 h artificial rumen technique, and the results showed that the inoculation with LAB improved the *in vitro* dry matter digestibility, pH value, NH₃-N and volatile fatty acid (VFA) concentrations were all within normal limits, and the total VFA concentration was SGL > LP > CK, so was the acetic acid and propionic acid. However, the addition of community SGL decreased the pH value more rapidly and had better effects on both silage quality and rumen fermentation, when compared with the single component LP. For SGL consists of variety of components, the interaction mechanism of components during the silage fermentation and the effect of switchgrass silages treated with SGL on the performance of the livestock need more study.

Key words: bacteria; fermentation; microbiology; lactic acid bacteria community; *Lactobacillus Plantarum*; switchgrass; silage; rumen fermentation