



耐低温乳酸菌的筛选鉴定及其对燕麦青贮发酵品质的影响

刘红玉 曾泰儒 张云飞 文兴金 刘海平 张磊 肖启银 李小梅 闫艳红

Screening and identification of low-temperature resistant lactic acid bacteria and its effect on fermentation quality of oat silage

LIU Hongyu, ZENG Tairu, ZHANG Yunfei, WEN Xingjin, LIU Haiping, ZHANG Lei, XIAO Qiyin, LI Xiaomei, YAN Yanhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0688>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高寒地区菊芋青贮物料耐低温乳酸菌的筛选与鉴定

Identification of low-temperature-tolerant lactic acid bacteria in *Helianthus tuberosus* silage in alpine regions

草业科学. 2024, 41(2): 480 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0895>

柱花草耐高温优质乳酸菌的筛选及其对青贮发酵品质的改善效果

Screening of high quality thermotolerant lactic acid bacteria in stylo and the improving effect on fermentation quality of its silage

草业科学. 2024, 41(2): 468 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0020>

构树源乳酸菌影响其青贮发酵品质

Effect of lactic acid bacteria from *Broussonetiapapyrifera* on silage fermentation

草业科学. 2023, 40(12): 3210 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0747>

乳酸菌制剂对灌溉区不同品种青饲玉米青贮发酵品质的影响

Effects of lactic acid bacteria preparation on silage fermentation qualities of different green corns in an irrigated area

草业科学. 2022, 39(8): 1653 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0611>

呼伦贝尔地区不同添加剂对燕麦青贮品质的影响

Effect of different additives on the quality of oat silage in Hulunbuir area

草业科学. 2022, 39(7): 1487 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0622>

麻叶荨麻青贮中优势乳酸菌的分离与鉴定

Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria from *Urtica cannabina* silage

草业科学. 2023, 40(5): 1410 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0659>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0688

刘红玉, 曾泰儒, 张云飞, 文兴金, 刘海平, 张磊, 肖启银, 李小梅, 闫艳红. 耐低温乳酸菌的筛选鉴定及其对燕麦青贮发酵品质的影响. 草业科学, 2025, 42(3): 669-678.

LIU H Y, ZENG T R, ZHANG Y F, WEN X J, LIU H P, ZHANG L, XIAO Q Y, LI X M, YAN Y H. Screening and identification of low-temperature resistant lactic acid bacteria and its effect on fermentation quality of oat silage. Pratacultural Science, 2025, 42(3): 669-678.

耐低温乳酸菌的筛选鉴定及其对燕麦青贮发酵品质的影响

刘红玉¹, 曾泰儒¹, 张云飞¹, 文兴金^{1,2}, 刘海平¹, 张磊¹,
肖启银³, 李小梅¹, 闫艳红¹

(1. 四川农业大学草业科技学院, 四川 成都 611130; 2. 四川省草原科学研究院, 四川 阿坝 624669;
3. 甘孜藏族自治州农业科学研究所, 四川 康定 626099)

摘要: 本研究旨在挖掘出低温条件下生长速率和产酸速率俱佳的乳酸菌, 并将其回接至若尔盖县白河牧场的青贮燕麦 (*Avena sativa*), 研究耐低温乳酸菌对燕麦青贮饲料发酵品质的影响。通过限制性培养方法筛选耐低温菌株, 并结合 16S rRNA 序列分析技术进行鉴定。结果表明, 1) 乳酸菌菌株 YZ3 在 4 °C 低温条件下产酸性能最佳 (pH 可达到 5.38), 且能耐低 pH (4.0) 和高盐浓度 (6.5% NaCl) 环境; 2) 通过生理生化试验、菌落形态、革兰氏染色以及 16S rRNA 序列分析表明, 乳酸菌 YZ3 为副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*); 3) 低温环境下 YZ3 处理的燕麦青贮乳酸含量升至 63.7 mg·g⁻¹, 显著高于无添加对照 ($P < 0.05$), 青贮料 pH 降低至 4.1, 显著低于无添加对照 ($P < 0.01$)。综上所述, 添加乳酸菌 YZ3 能够改善燕麦的青贮发酵品质, YZ3 可作为川西北高寒地区的低温青贮菌株。

关键词: 耐低温乳酸菌; 产酸速率; 燕麦; 发酵品质; 川西北高原; 营养品质; 厌氧发酵

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2025)03-0669-10

Screening and identification of low-temperature resistant lactic acid bacteria and its effect on fermentation quality of oat silage

LIU Hongyu¹, ZENG Tairu¹, ZHANG Yunfei¹, WEN Xingjin^{1,2}, LIU Haiping¹,
ZHANG Lei¹, XIAO Qiyin³, LI Xiaomei¹, YAN Yanhong¹

(1. College of Grassland Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China;
2. Sichuan Academy of Grassland Sciences, Aba 624669, Sichuan, China;
3. Agricultural Science Research Institute of Ganzi District, Kangding 626099, Sichuan, China)

Abstract: We aimed to explore the effects of lactic acid bacteria with good growth rate and resistant to low temperature conditions on the fermentation quality of oat silage in Baihe Ranch of Ruorgai County. The low temperature-resistant strains were screened using the restrictive culture method and identified using 16S rRNA sequence analysis. The results showed that: 1) *Lactobacillus* strain YZ3 had the best growth rate and acid production performance at the low temperature of 4 °C (pH could reach 5.38), and could tolerate low pH (4.0) and high salt concentration (6.5% NaCl). 2) The strain YZ3 was identified as *L. paracasei* by physiological and biochemical tests, colony morphology, Gram staining, and 16S rRNA

收稿日期: 2023-12-13 接受日期: 2024-04-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32271766)

第一作者: 刘红玉 (1997-), 女, 甘肃兰州人, 在读硕士生, 研究方向为牧草栽培及加工. E-mail: 2375806626@qq.com

通信作者: 闫艳红 (1981-), 女, 山西交城人, 教授, 博士, 研究方向为饲草生产及利用. E-mail: yanyanhong3588284@126.com

sequence analysis. 3) Under a low temperature environment, the lactic acid content of oat silage treated with YZ3 increased to $63.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, which was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$), and the pH of silage decreased to 4.1, which was significantly lower than that of the control ($P < 0.01$). In summary, the addition of lactic acid bacteria YZ3 improved the silage fermentation quality of oats and can be used as a low-temperature silage strain in the alpine region of northwest Sichuan.

Keywords: low-temperature resistant lactic acid bacteria; acid production rate; oat silage; fermentation quality; Northwest Sichuan Plateau; nutritional quality; anaerobic fermentation.

Corresponding author: YAN Yanhong E-mail: yanyanhong3588284@126.com

川西北地区位于四川省西北部, 青藏高原东南缘, 是全国五大牧区之一, 草地畜牧业是当地重要的经济支柱产业^[1-2]。当地海拔高, 积温不足, 导致饲草生长季短, 产量低, 供需矛盾突出, 严重限制畜牧业持续、健康发展。此外, 受湿冷气候的限制, 收获季节干草难以调制, 青贮技术在延长饲料保存时间的同时最大限度地保留饲料的营养成分, 是川西北地区饲料保存的有效方法之一^[3-4]。

乳酸菌在青贮饲料制作过程中具有重要作用, 能够将青贮饲料中的碳水化合物代谢为乳酸和乙酸等有机酸, 降低 pH, 抑制有害微生物的活性, 减少蛋白质和干物质损失, 从而改善青贮发酵品质, 延长青贮饲料的保存时间^[5-6]。但乳酸菌具有专一性和特异性, 在不同的环境温度下生长繁殖情况有所差异, 乳酸菌的最适生长温度通常在 $25 \sim 37^\circ\text{C}$ ^[7-9]。低温胁迫时, 乳酸菌生长缓慢, 且过低的温度会造成乳酸菌细胞机械损伤, 破坏细胞膜原有的结构, 影响细胞功能的正常发挥。研究发现, 在低温处理下, 青贮饲料 pH 显著升高, 乳酸含量显著降低, 在 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ 温度下青贮饲料产生的乙酸水平高于 5°C 或 10°C 处理的青贮饲料, 5°C 下青贮饲料的乳酸和乙酸含量均显著 ($P < 0.01$) 低于 20°C 处理下的青贮饲料, 达到青贮稳定的时间增加, 致使青贮饲料干物质、粗蛋白等营养物质大量损失^[10-11]。目前, 常见商业青贮乳酸菌由于低温下生长受到限制, 不适于作为低温地区的青贮发酵乳酸菌^[12-14]。川西北地区气候严寒, 在 7 月后气温迅速降低到 15°C 以下, 乳酸菌活性也随之迅速降低。因此, 筛选耐低温的青贮乳酸菌对改善当地青贮品质至关重要^[15]。极端环境会对菌群的耐胁迫能力产生影响, 在湿冷气候区域更容易筛选出在低温环境下生长良好、产酸速率快的乳酸菌, 所以在川西北地区极端低温环

境下筛选耐低温乳酸菌具有可行性^[16]。

燕麦 (*Avena sativa*) 是一种一年生禾本科粮饲兼用作物, 由于其喜凉、营养价值高等特性在川西北地区被广泛种植^[17]。本研究从川西北地区的燕麦、玉米 (*Zea mays*) 青贮材料中筛选产酸快且生长活性好的耐低温乳酸菌, 回接到燕麦青贮料中验证其发酵效果, 以期发掘和利用川西北地区本土乳酸菌, 旨在为当地青贮提供可利用的乳酸菌添加剂, 改善当地青贮饲料品质。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究对四川省阿坝藏族羌族自治州泸定县泸桥镇、松潘县安宏乡、红原县瓦切镇、若尔盖县唐克乡、道孚县八美镇共 6 个地点的牧草以及原料进行采样, 样点的基本环境信息和采样信息如表 1 所列, 供试玉米品种为‘凉单 10 号’, 燕麦品种为‘青引 3 号’。青贮饲料裹包开袋后, 取上、中、下三部分的样品, 充分混匀后置于无菌袋中, 取 10 株玉米粉碎后混合, 得到玉米鲜样。所取材料用冰袋保鲜, 当天运回实验室, 用于后续乳酸菌的分离。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的分离与纯化

称取所有采集样品各 20 g 置于无菌锥形瓶中, 加入 180 mL 灭菌的生理盐水, 在 4°C 摇床上充分震荡 1.5 h, 取液体进行 10 倍梯度稀释, 选择适合浓度梯度 (1×10^{-1} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-5}) 在 MRS (Man Rogosa Sharpe, 北京陆桥技术有限责任公司) 培养基上分别进行涂板, 将培养基置于 15°C 恒温无氧密封条件下培养 5 d 后^[17], 观察乳酸菌生长情况, 依据菌落形态挑选出不同的乳酸菌菌落并连续分离和纯化两

表 1 样品类型和取样地点
Table 1 Collection sites and types of samples

采样地点 Sampling site	样品类型 Sample type	海拔 Altitude/m	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	年均温度 Annual temperature/℃	取样时间 Sampling time/ (YYYY-MM)
泸定县泸桥镇 Luqiao Town, Luding County	青贮燕麦 Silage oat	1 406	101°46′~102°25′	29°54′~30°10′	12~22	2019-07
松潘县安宏乡 Anhong Township, Songpan County	青贮玉米 Silage corn	2 850	102°38′~104°15′	32°06′~33°09′	0~14	2019-03
红原县瓦切镇 Waqie Town, Hongyuan County	青贮燕麦 Silage oat	3 458	101°51′~103°22′	31°51′~33°33″	-4~11	2019-05
若尔盖县唐克乡 Tangke Township, Zoige County	青贮玉米 Silage corn	3 431	102°08′~103°39′	32°56′~34°19′	-3~10	2019-06
道孚县八美镇 Bamei Town, DaoFu County	玉米鲜样 Fresh corn	3 500	100°32′~101°44′	32°21′~30°32′	2~18	2019-10

次, 然后对菌株进行革兰氏染色、镜检观察、过氧化氢酶试验, 初步确定革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的菌株为乳酸菌, 最后将已鉴定的乳酸菌加入含灭菌甘油的液体 MRS 培养基中, 并于-80 ℃ 保存^[18]。

1.2.2 耐低温乳酸菌筛选

将低温保存的乳酸菌快速解冻后接种至 MRS 液体培养基中活化培养 (37 ℃, 48 h), 进行两次传代后, 按照 3% 的液体比例 (V/V) 将乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中 15 ℃ 培养 72 h^[19], 并分别在 4、6、12、24、36、48、72 h 用分光光度计在 600 nm 处测定其 OD 值 (吸光度) 和 pH, 分析乳酸菌在低温条件下的产酸能力及其对低温的适应能力, 挑选出生长产酸性能最佳的耐低温菌。OD < 0.05 时记为不生长, 0.05 < OD < 0.1 时记为微弱生长, 0.1 < OD < 0.5 时记为生长, OD > 0.5 时记为生长良好^[20]。

15 ℃ 条件下对生长、产酸性能最佳的菌株进行葡萄糖产气试验, 并接种于 10 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 恒温培养, 分别于 4、6、12、24、36 和 48 h 在 600 nm 处测定吸光值和 pH, 同时在 4、10 和 15 ℃ 中培养 5 d, 测定其不同低温条件下的生长性能和产酸速率, 以筛选出生长速率最快、产酸效率最高和低温耐受性能最佳的乳酸菌, 并将其保存。

1.2.3 耐低温乳酸菌的鉴定

将最优乳酸菌在 37 ℃ 厌氧条件下培养 48 h 后, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取 DNA, 并进行 16S rRNA 扩增, 引物序列: 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。然后, 将 PCR 扩增产物送至北京擎科生物技术有限公司

进行基因序列测定。将测序所得到的序列在 GenBank 数据库进行 BLAST, 比较序列相似性, 并使用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.2.4 自选菌株的生理生化特性测定

对耐低温乳酸菌、模式菌株 (LPA, *Lactobacillus paracasei* ATCC 334, 购自中国微生物菌种保藏中心) 和商业植物乳杆菌 (LPC, *Lactobacillus plantarum*, 四川高福记生物技术有限公司) 进行葡萄糖产气试验, 然后将菌株接种至 NaCl 浓度为 3.0% 和 6.5% 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 下培养 2 d 后, 测定其耐盐性。再将菌株分别置于 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 下培养 3 d 后, 测定乳酸菌的耐酸性^[21]。通过糖源发酵测定 3 株乳酸菌对 21 种不同糖的利用情况, 及 4、10、15、20、30 和 40 ℃ 下的生长性能。

1.2.5 青贮调制

2022 年 8 月底, 在若尔盖县白河牧场 (102°08′~103°39′ E, 32°56′~34°19′ N) 收割抽穗期的全株燕麦, 用揉丝机切碎至 1~2 cm, 待含水量 65%~70%, 将筛选菌株 YZ3 添加于当地的燕麦草材料中进行窖贮, 乳酸菌添加量为 1×10⁶ cfu·g⁻¹, 燕麦材料中加入等体积无菌去离子水进行窖贮, 作为对照组, 两组青贮温度为 4~15 ℃, 青贮窖为千吨窖, 青贮 90 d 后开窖。

1.2.6 营养成分测定

开窖取样后测定燕麦青贮干物质 (dry matter, DM)、粗蛋白 (crude protein, CP)、中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF)、可溶性碳水化合物 (water soluble carbohydrates, WSC)。CP 含量采用 GB/T 6432—1994

测定, NDF 含量采用 NY/T 1459—2007 方法测定, ADF 含量采用 GB/T 20806—2006 方法测定, 可溶性碳水化合物含量采用 T/HXCY 023—2021 测定。

1.2.7 发酵指标测定

青贮取样后, 取 20 g 青贮材料放入灭菌锥形瓶中, 加入 180 mL 蒸馏水, 在 4 °C 条件下浸泡 24 h 后, 使用 PHS-3C 型 pH 计测定 pH。氨态氮 ($\text{NH}_3\text{-N/TN}$) 含量依据 Broderick 等^[22]所用的方法测定, 使用岛津高效液相色谱仪测定乳酸 (lactic acid, LA)、乙酸 (acetic acid, AA)、丙酸 (propionic acid, PA)、丁酸 (butyric acid, BA) 的含量, 所用色谱柱为 Shodex Rspak KC-811 S-DVB gel column, 检测器为 SPD-M10AVP, 使用的流动相为 3 mmol·L⁻¹ 高氯酸溶液, 设置的流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温 50 °C, 检测的波长为 210 nm, 进样量 5 μL 。

1.3 数据统计与分析

采用 Excel 对数据进行初步处理, 使用 SPSS 23.0 进行单因素方差分析, Duncan 法进行均值的多

重比较, 并进行指标间的相关性和回归性分析, 对不同菌株测定指标以及不同处理发酵品质数据进行显著性分析 ($P < 0.05$, 显著; $P < 0.01$, 极显著)。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化及耐低温菌株筛选

对川西北高原 5 个地点的青贮样品和原料进行分离纯化、革兰氏染色、镜检和过氧化氢酶试验, 获得 103 株乳酸菌, 将其在 15 °C 条件下培养, 得到生长速率和产酸速率获得性状优良 (48 h $\text{OD}_{600\text{ nm}} > 0.5$) 的 7 株乳酸菌 WQ2、WQ16、WQ19、WQ20、YZ1、YZ2 和 YZ3, 7 株乳酸菌均为杆状 (图 1)。

在 37 °C 条件下, YZ3 在前 12 h 的生长性能明显优于其他菌株, 在 12 h 时达到峰值, 且产酸能力强于其他 5 种菌株, 在 37 °C 条件下的综合性能最佳 (图 2)。15 °C 条件下, 除 WQ16、YZ1 的生长微弱, 其他菌株均能正常生长, 产酸能力与生长性能趋于一致; 在 10 °C 条件下, WQ19、YZ3 菌株的生长

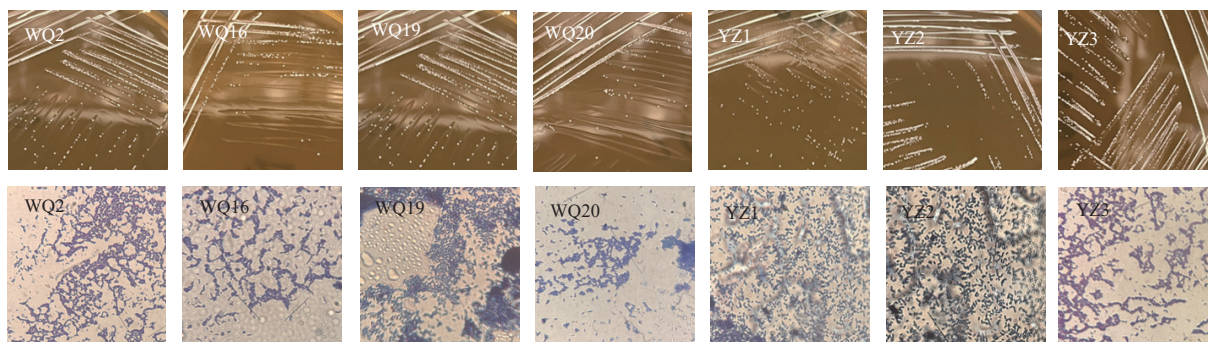


图 1 7 种乳酸菌的胞形态和菌落分离形态

Figure 1 The cell morphology and colony separation morphology of seven kinds of lactic acid bacteria

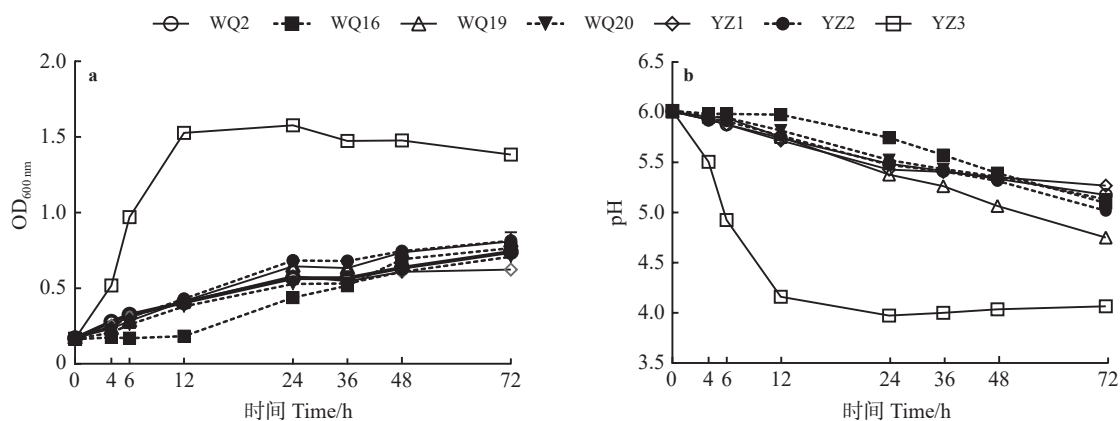


图 2 37 °C 下乳酸菌的生长速率 (a) 和产酸速率 (b)

Figure 2 The growth rate (a) and acid production rate (b) of lactic acid bacteria under 37 °C

性能最强,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),且 YZ3 的产酸能力显著强于 WQ19 ($P < 0.05$);在 4 ℃ 条件下,WQ19 生长能力最强,YZ3 次之,但 YZ3 产酸能力与 WQ19 相比显著增强 ($P < 0.05$) (图 3)。综上,在 3 个低温条件下,YZ3 在 6 株菌株中生长产酸综合性能最佳。

2.2 耐低温乳酸菌生理特性分析

耐低温乳酸菌生理特性分析表明 (表 2),YZ3、LPA 和 LPC 均可利用菊粉、水杨苷、山梨醇、蔗糖、D-果糖、D-甘露醇、马尿酸、麦芽糖、棉子糖、D-甘露糖、水杨素、乳糖、D-葡萄糖、半乳糖;均不可利用木糖、鼠李糖。YZ3 不可利用阿拉伯糖、半固体琼脂、蜜二糖、苦杏仁苷、D-海藻糖。LPC 的糖源利用范围最广,YZ3 的糖源利用范围最窄,但与 LPA 相比,YZ3 可发酵纤维二糖。

耐低温乳酸菌 (YZ3)、模式菌株 (LPA)和商业植

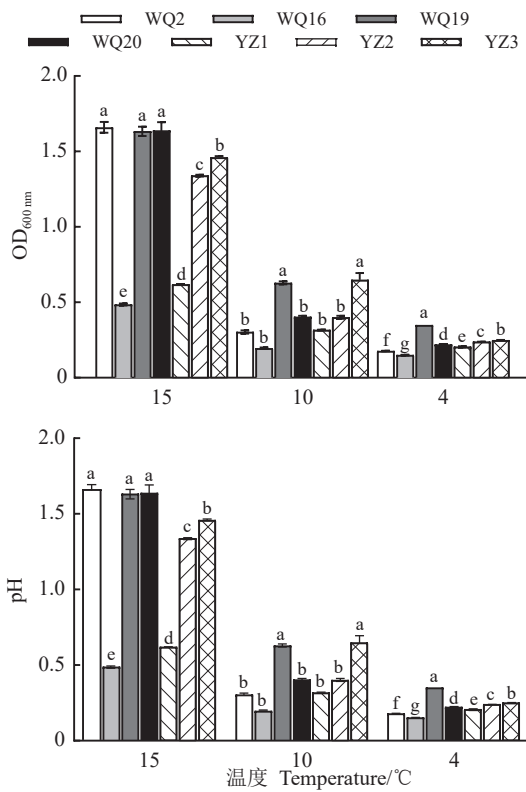


图 3 不同温度下乳酸菌的生长及产酸能力

Figure 3 The growth and acid production capacity at different temperatures

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant differences between the different treatments at the 0.05 level.

表 2 乳酸菌糖发酵特性
Table 2 Characteristics of sugar fermentation of lactic acid bacteria

项目 Item	YZ3	LPA	LPC
菊粉 Inulin	W	+	+
水杨苷 Salicin	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	—	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+
蔗糖 Saccharose	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	+	+
D-果糖 D-Fructose	+	+	+
木糖 Xylose	—	—	—
D-甘露醇 D-Mannitol	+	+	+
马尿酸 Hippuric acid	W	+	W
麦芽糖 Maltose	+	+	+
半固体琼脂 Semi-solid agar	—	—	+
棉子糖 Raffinose	+	+	+
蜜二糖 Melibiose	—	+	+
D-甘露糖 D-Mannose	+	+	+
水杨素 Salicin	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+
D-葡萄糖 D-Glucose	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+
苦杏仁苷 Amygdalin	—	+	+
D-海藻糖 D-Trehalose	—	+	+
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—

YZ3为筛选菌株;LPA为模式菌株副干酪乳杆菌;LPC为商业植物乳杆菌。“+”为生长良好或阳性,“—”为不生长或阴性,“W”为微弱生长。表3同。

YZ3, the screened strain; LPA, model strain of *Lactobacillus paracasei* ATCC 334; LPC, commercial *Lactobacillus plantarum*. “+”, good growth or positive, “—”, no growth or negative, and “W”, weak growth. This is applicable for Table 3 as well.

物乳杆菌 (LPC) 的生理生化试验结果表明 (表 3), 3 株乳酸菌均为革兰氏阳性和过氧化氢酶阴性的杆状细菌, LPA 和 YZ3 为异质发酵乳酸菌, LPC 为同型乳杆菌。通过温度试验,发现 YZ3 和 LPA 在 4 和 10 ℃ 条件下可以生长,在 15、20、30、40 ℃ 条件下生长良好;LPC在 4、10、15 ℃ 条件下缓慢生长,在

表 3 乳酸菌的生理生化特性测定
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria

项目 Item	YZ3	LPA	LPC
形状 Shape	杆状 Rod	杆状 Rod	杆状 Rod
革兰氏染色 Gram's stain	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase test	—	—	—
葡萄糖产气 Gas production	+	+	—
发酵类型 Fermentation types	异型 Hetero	异型 Hetero	同型 Homo
温度 Temperature	4 ℃	W	W
	10 ℃	W	W
	15 ℃	+	+
	20 ℃	+	+
	30 ℃	+	+
	40 ℃	+	+
NaCl	3.0%	+	+
	6.5%	+	+
	3.0	W	—
pH	3.5	W	W
	4.0	+	+
	4.5	+	+
	5.0	+	+
	5.5	+	+
	6.0	W	+
	6.5	—	+
	7.0	—	+

20、30、40 ℃ 条件下生长良好；YZ3、LPA 和 LPC 均能在 3% 和 6.5% NaCl 浓度下稳定生长；YZ3 在 pH 为 3.0、3.5、6.0 时缓慢生长，在 pH 为 4.0~5.5 时生

长良好；LPA 与 LPC 在 pH 为 3.0 时不生长，LPA 在 pH 为 3.5~4.0 时微弱生长，其余 pH 时生长良好；LPC 在 pH 为 3.5 时微弱生长，其余 pH 时良好生长。

2.3 耐低温乳酸菌的分子鉴定

对乳酸菌 YZ3 和其模式菌株的 16S rRNA 区域序列进行系统发育分析 (图 4)，根据 NCBI 上 GenBank 的搜索结果，将与乳酸菌 YZ3 和已知乳酸菌的 16S rRNA 序列进行比较，构建系统发育树，乳酸菌 YZ3 与模式菌株 *Lactobacillus paracasei* R094 在同一分支聚集，且进化亲缘度为 100%，再结合其油镜镜检形状为杆状以及其他生理生化指标，乳酸菌 YZ3 鉴定为副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)，菌株 YZ3 来自红原县瓦切镇的燕麦青贮材料。

2.4 耐低温乳酸菌对燕麦青贮品质的影响

在燕麦青贮中添加 YZ3 后，粗蛋白含量显著 ($P < 0.05$) 高于对照，干物质、中性洗涤纤维含量无显著变化，可溶性碳水化合物含量较对照降低 5.41%，酸性洗涤纤维含量较对照升高 6.1% (表 4)。将 YZ3 添加于燕麦中进行青贮发酵，添加 YZ3 后 pH 降低至 4.11，显著低于对照组 5.1% ($P < 0.01$)，乳酸含量为 $63.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，较对照组显著升高 48.10% ($P < 0.01$)。添加 YZ3 后，乙酸比对照组显著低 $1.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.01$)，丙酸含量为 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，较对照组显著降低 76.69% ($P < 0.01$)，丁酸含量为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，较对照组降低 19.2% (图 5)。

3 讨论

乳酸菌的生长速率与产酸速率直接影响着青贮的发酵品质，是优质乳酸菌的重要评价指标^[23-24]。作为青贮添加剂的乳酸菌菌株应具有耐酸性强、生长速度快的特征，在短时间内降低 pH，抑制有害微

表 4 添加乳酸菌对燕麦营养品质的影响
Table 4 Effects of adding lactic acid bacteria on the nutritional quality of oats

处理 Treatment	DM/%	WSC/%	CP/%	NDF/%	ADF/%
CK	24.96 ± 0.29	5.91 ± 0.17	4.57 ± 0.05b	52.67 ± 0.37	37.12 ± 0.24
YZ3	24.11 ± 0.24	5.59 ± 0.19	5.13 ± 0.03a	51.93 ± 0.36	39.38 ± 0.61

DM, 干物质; WSC, 可溶性碳水化合物; CP, 粗蛋白; NDF, 中性洗涤纤维; ADF, 酸性洗涤纤维。同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。
DM, dry matter; WSC, water soluble carbohydrates; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber. Different lowercase letters within the same column indicate significant differences between the different treatments at the 0.05 level.

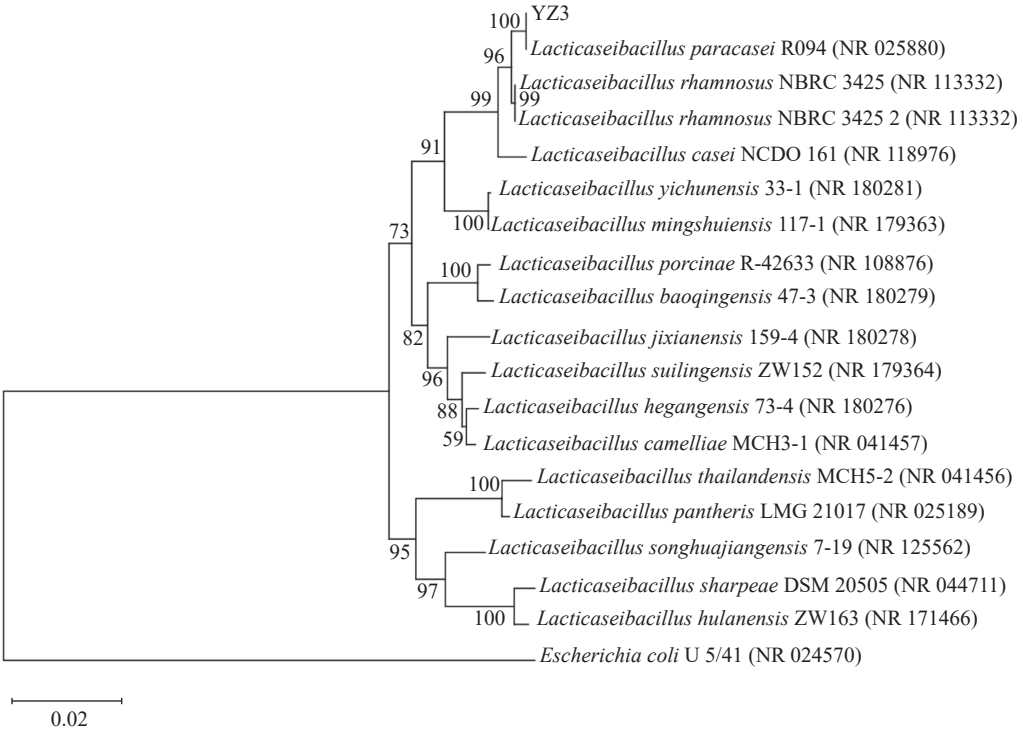


图 4 YZ3 菌株系统进化树
Figure 4 Phylogenetic tree of the YZ3 strain

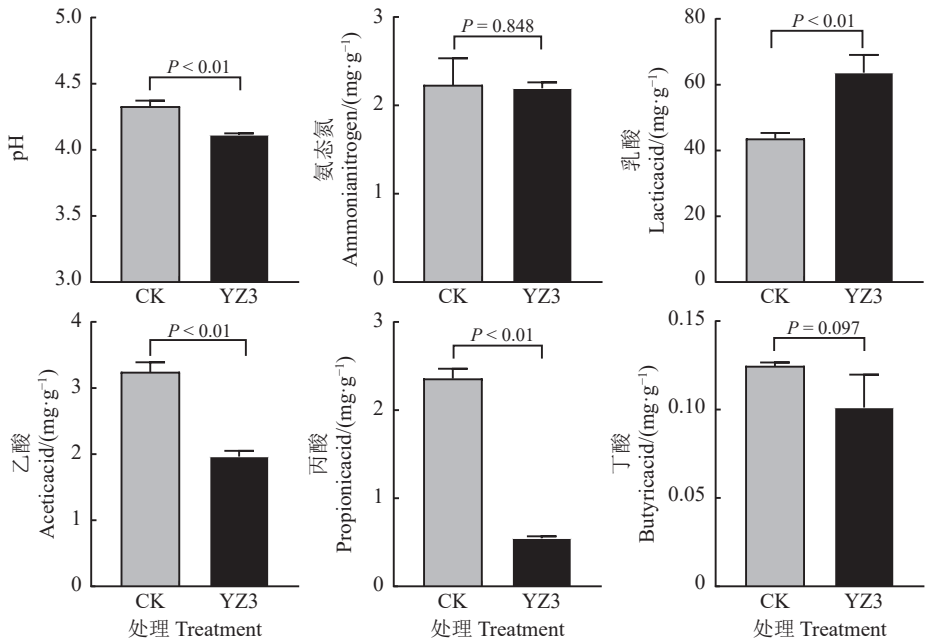


图 5 添加乳酸菌对燕麦 pH、氨态氮、有机酸的影响
Figure 5 Effects of adding lactic acid bacteria on oat pH, ammonia nitrogen, and organic acid

生物的生长,而且能够广泛的利用各种糖源,在大多环境条件下均可良好生长^[25-26]。本研究从川西北地区的青贮材料以及鲜样中筛选得到的乳酸菌 YZ3,其生长速率和耐酸性良好,在 6.5% NaCl 条件下正常生长,其与模式菌株 *Lactobacillus paracasei* R094 进化亲缘度为 100%,结合菌株生理生化特性,鉴定其为副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*),其与 Xu 等^[27]筛选出的耐低温戊糖片球菌 (*Pediococcus*

pentosaceus) 相比能利用乳糖发酵, 糖源利用范围较为广泛, 且其低温耐受性和耐酸性均优于 LPC。因此, YZ3 糖源利用范围虽不如 LPC 和 LPA, 但是其更耐酸耐低温, 适合作为川西北地区的乳酸菌添加剂。

低温环境对青贮品质产生影响是由于乳酸菌对外界环境的胁迫较为敏感, 在燕麦中添加乳酸菌可以直接或者间接改变青贮发酵的进程, 显著提高青贮料的发酵品质^[28]。有机酸含量是评判青贮品质的重要指标, 其组分和含量能够反映青贮发酵品质的优劣。在燕麦青贮中, 乳酸含量对 pH 的影响最大, 在燕麦中添加乳酸菌可以直接或者间接改变青贮发酵的进程, 显著提高青贮料的发酵品质^[29-30]。在本研究中, 在燕麦青贮中添加乳酸菌 YZ3, 乳酸含量显著 ($P < 0.01$) 高于对照组, 王鹏等^[31]在芦苇 (*Phragmites australis*) 中添加耐低温乳酸菌也得到了相同的结果。柴继宽等^[32]在燕麦中分别添加了耐低温的戊糖片球菌、戊糖乳杆菌和植物乳杆菌, 并设置了 4、10、15 °C 共 3 个温度梯度, 发现随着温度降低, 青贮饲料中的乳酸含量和乙酸含量显著降低, 与对照相比, 添加乳酸菌显著提高了燕麦低温青贮

的青贮品质。本研究中 YZ3 处理的燕麦青贮中乳酸含量显著高于对照, 经过添加 YZ3 使青贮 pH 显著降低, 这与陆永祥等^[33]在青藏高原添加布氏乳杆菌得到的研究结果一致。丁酸作为一个对青贮品质有负面影响的物质, 是丁酸梭菌分解蛋白质的产物, 其不仅是营养物质流失的表现, 还会产生恶臭, 影响动物对饲料的采食量, 而 YZ3 处理后能够使燕麦青贮中丁酸含量降低^[34-35]。本研究中, 在燕麦青贮中添加 YZ3 后, 粗蛋白含量显著高于对照 ($P < 0.05$), 这与柴继宽等^[32]的研究结果一致。在本研究中, 以生长速率和产酸速率作为乳酸菌的筛选指标, 筛选得到副干酪乳杆菌 YZ3, 其在低温条件下生长快, 产酸迅速, 可以作为川西北地区调制青贮的备选添加菌株。

4 结论

本研究筛选出适合川西北环境的副干酪乳杆菌 YZ3, 其在低温和高盐条件下生长良好且产酸能力强。添加至川西北高原燕麦青贮中, 可提升发酵品质。因此, YZ3 适合作为川西北高原牧草青贮的乳酸菌菌株。

参考文献 References:

- [1] 陈晓霞. 川西北典型牧区草地 NPP 和家畜时空分布及其影响因素分析. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2023.
CHEN X X. Spatio-temporal distribution and influencing factors of grassland net primary productivity and grazing livestock of typical pastoral area in Northwest Sichuan. Master Thesis. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2023.
- [2] 伍文宪, 张蕾, 黄小琴, 杨潇湘, 薛龙海, 刘勇. 川西北高寒牧区不同人工草地对土壤微生物多样性影响. *草业学报*, 2019, 28(3): 29-41.
WU W X, ZHANG L, HUANG X Q, YANG X X, XUE L H, LIU Y. Difference in soil microbial diversity in artificial grasslands of the Northwest plateau of Sichuan Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(3): 29-41.
- [3] 徐伟. 青藏高原高寒牧区紫花苜蓿青贮及青干草调制研究. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2014.
XU W. Study on alfalfa silage and hay modulation in alpine pasture of Qinghai-Tibet Plateau. PhD Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014.
- [4] 李平, 李世洪, 沈益新, 白史且. 川西北高寒牧区青贮调制技术研究现状. *草学*, 2017(6): 4-11.
LI P, LI S H, SHEN Y X, BAI S Q. Research process in forage silage in alpine pasture of Northwest Sichuan Province. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2017(6): 4-11.
- [5] WILKINSON J M, MUCK R E. Ensiling in 2050: Some challenges and opportunities. *Grass and Forage Science*, 2019, 74(2): 178-187.
- [6] MUELLER I, KESSELLRING J, VROTHIAKIENE V, JATKAUSKAS J. Inoculation of whole-plant maize with viable lactic acid bacteria: Effects on silage fermentation, aerobic stability and performance of dairy cows. *Žemdirbystė Agriculture*, 2022, 109(1): 81-88.
- [7] KUNG J L M, SHAVER R D, GRANT R J, SCHMIDT R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic

- components of silages. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4020-4033.
- [8] WANG Y, HE L W, XING Y Q, ZHOU W, PIAN R Q, YANG F Y, CHEN X Y, ZHANG Q. Bacterial diversity and fermentation quality of *Moringa oleifera* leaves silage prepared with lactic acid bacteria inoculants and stored at different temperatures. *Bioresource Technology*, 2019, 284: 349-358.
- [9] LIU Q H, CHEN M X, ZHANG J G, SHI S L, CAI Y M. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. *Animal Science Journal*, 2012, 83(2): 128-135.
- [10] 靳思玉, 王立超, 李苗苗, 曹阳. 低温下乳酸菌对全株玉米青贮微生物组成及发酵品质的影响. *草学*, 2019(S1): 37-39.
- JIN S Y, WANG L C, LI M M, CAO Y. Effects of lactic acid bacteria on microbial composition and fermentation varieties of maize at low temperature. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2019(S1): 37-39.
- [11] ZHOU Y, DROUIN P, LAFRENIERE C. Effect of temperature (5~25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 657-671.
- [12] 崔棹茗. 农作物秸秆青贮饲料中耐低温乳酸菌的筛选、鉴定及验证研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2015.
- CUI Z M. Study on the screening, identifying and application of low temperature-tolerant lactic acid bacteria from crop straw silage in Tibet. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [13] 储徐建, 李长慧, 刘明灿, 李彩娟, 赵明霞. 耐低温乳酸菌的分离与优化培养. *草业科学*, 2014, 31(7): 1380-1388.
- CHU X J, LI C H, LIU M C, LI C J, ZHAO M X. Isolation and optimization of low temperature lactic acid bacteria. *Pratacultural Science*, 2014, 31(7): 1380-1388.
- [14] LI F H, DING Z T, KE W C, XU D M, ZHANG P, BAI J, MUDASSAR S, MUHAMMAD I, GUO X S. Ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria and cellulase pretreatments of corn stalk silage at two different temperatures: Ensiling characteristics, carbohydrates composition and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 2019, 282: 211-221.
- [15] 李平. 改善川西北高寒牧区老芒麦和燕麦青贮发酵品质的研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2019.
- LI P. Study on improvement or ensiling characteristics of Siberian wildrye and oat in alpine pastoral area of Northwest Sichuan Province. PhD Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [16] 陈龙, 魏炳栋, 郑琳, 张莹, 闫晓刚, 于维. 长白山原始森林土壤源耐低温乳酸菌的筛选. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(10): 3103-3113.
- CHEN L, WEI B D, ZHENG L, ZHANG Y, YAN X G, YU W. Screening of psychrotrophic lactic acid bacteria from Changbai Mountain soil. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020, 47(10): 3103-3113.
- [17] 彭先琴, 周青平, 刘文辉, 魏小星, 田莉华, 陈有军, 王沛. 川西北高寒地区 6 个燕麦品种生长特性的比较分析. *草业科学*, 2018, 35(5): 1208-1217.
- PENG X Q, ZHOU Q P, LIU W H, WEI X X, TIAN L H, CHEN Y J, WANG P. A comparative analysis of growth characteristics of six oat cultivars in the north-western Sichuan alpine region. *Pratacultural Science*, 2018, 35(5): 1208-1217.
- [18] 李小铃, 关皓, 闫艳红, 张新全. 狼尾草属牧草青贮优良乳酸菌的筛选及生理生化特性研究. *草学*, 2018(4): 27-35.
- LI X L, GUAN H, YAN Y H, ZHANG X Q. Screening and physiological-biochemical characteristics of good lactic acid bacteria from *Pennisetum* Rich. silage. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2018(4): 27-35.
- [19] 王红梅, 孙启忠, 屠焰, 司丙文, 萨如拉, 那亚, 刁其玉. 呼伦贝尔草原野生牧草青贮中优良乳酸菌的分离及鉴定. *草业学报*, 2016, 25(8): 189-196.
- WANG H M, SUN Q Z, TU Y, SI B W, Sarula, Naya, DIAO Q Y. Isolation and identification of high-quality lactic acid bacteria from wild forage silages on the Hulunbuir prairie. *Acta Pratacultural Sinica*, 2016, 25(8): 189-196.
- [20] 保安安. 青藏高原不同地区垂穗披碱草青贮饲料中乳酸菌多样性及优势菌种的发酵特性研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2016.
- BAO A A. Study on biodiversity and fermentation characteristics of lactic acid bacteria in *Elymus nutans* silage ensiled at different areas of the Qinghai-Tibetan Plateau. Master Thesis. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
- [21] PANG H L, ZHANG M, QIN G Y, TAN Z F, LI Z W, WANG Y P, CAI Y M. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Animal Science Journal*, 2011, 82(5): 642-653.
- [22] WANG S R, YUAN X J, DONG Z H, LI J F, SHAO T. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from different sources and

- their effects on the silage quality of oat (*Avena sativa* L.) straw on the Tibetan Plateau. *Grassland Science*, 2018, 64(2): 128-136.
- [23] 李世丹, 陈仕勇, 马莉, 王泰. 青藏高原川西北高寒牧区黑麦青贮饲料中耐低温乳酸菌的分离与鉴定. *草原与草坪*, 2018, 38(6): 79-82, 88.
- LI S D, CHEN S Y, MA L, WANG T. Isolation and identification of low temperature tolerant lactic acid bacteria from *Secale cereal* silages in the alpine pastoral area of northwest Sichuan. *Grassland and Turf*, 2018, 38(6): 79-82, 88.
- [24] 徐泽平, 肖润, 沈诗桀, 沈以红, 黄先智, 向钊. 桑叶青贮中的微生物变化与青贮品质改良. *草业科学*, 2020, 37(9): 1912-1925.
- XU Z P, XIAO R, SHEN S J, SHEN Y H, HUANG X Z, XIANG Z. Microbial changes in and quality improvement of mulberry leaf silage. *Pratacultural Science*, 2020, 37(9): 1912-1925.
- [25] 蔺豆豆, 琚泽亮, 柴继宽, 赵桂琴. 青藏高原燕麦附着耐低温乳酸菌的筛选与鉴定. *草业学报*, 2022, 31(5): 103-114.
- LIN D D, JU Z L, CHAI J K, ZHAO G Q. Screening and identification of low temperature tolerant lactic acid bacterial epiphytes from oats on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Acta Prataculturac Sinica*, 2022, 31(5): 103-114.
- [26] 张红梅, 段珍, 李霞, 梁建勇, 张建华, 李晓康. 青贮饲料乳酸菌添加剂的应用现状. *草业科学*, 2017, 11(12): 2575-2583.
- ZHANG H M, DUAN Z, LI X, LIANG J Y, ZHANG J H, LI X K. Actual research and application of the silage lactic acid bacteria additives. *Pratacultural Science*, 2017, 11(12): 2575-2583.
- [27] XU D M, KE W C, ZHANG P, LI F H, GUO X S. Characteristics of *Pediococcus pentosaceus* Q6 isolated from *Elymus nutans* growing on the Tibetan Plateau and its application for silage preparation at low temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(1): 40-48.
- [28] 秦丽萍. 青藏高原垂穗披碱草青贮饲料中耐低温乳酸菌的筛选及其发酵性能研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2014.
- QIN L P. Screening of lactic acid bacteria for low temperature fermentation from silage of *Elymus nutans* growing on the Tibetan Plateau and study on its fermentation properties. Master Thesis. Lanzhou: Lanzhou University, 2014.
- [29] 刘伟, 贾玉山, 格根图, 王志军, 刘明建, 司强, 包健, 刘逸超, 孙鹏波. 燕麦青贮研究进展. *草地学报*, 2022, 30(12): 3175-3183.
- LIU W, JIA Y S, Gegentu, WANG Z J, LIU M J, SI Q, BAO J, LIU Y C, SUN P B. Research advance of oat silage. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(12): 3175-3183.
- [30] ROMERO J J, ZHAO Y, BALSECA-PAREDES M A, TIEZZI F, GUTIERREZ-RODRIGUEZ E, CASTILLO M S. Laboratory silo type and inoculation effects on nutritional composition, fermentation, and bacterial and fungal communities of oat silage. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(3): 1812-1828.
- [31] 王鹏, 白春生, 刘林, 曹兵海. 低温条件下混合乳酸菌制剂对芦苇发酵品质的影响. *草地学报*, 2011, 19(1): 127-131.
- WANG P, BAI C S, LIU L, CAO B H. Effects of lactic acid bacteria inoculant on the fermentation quality of reed grass (*Phragmites australis* Cav. Trin. ex Sterd.) at low temperature. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(1): 127-131.
- [32] 柴继宽, 赵桂琴, 琚泽亮. 添加不同乳酸菌对燕麦低温青贮发酵的影响. *草地学报*, 2023, 31(3): 923-928.
- CHAI J K, ZHAO G Q, JU Z L. Effects of adding different lactic acid bacteria on oat silage fermentation at low temperatures. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(3): 923-928.
- [33] 陆永祥, 赵嫚, 陈良寅, 成启明, 游明鸿, 李达旭, 陈仕勇, 白史旦, 李平. 布氏乳杆菌和甲酸对青藏高原不同物候期燕麦青贮饲料发酵品质和细菌群落的影响. *草地学报*, 2020, 28(6): 1736-1743.
- LU Y X, ZHAO M, CHEN L Y, CHENG Q M, YOU M H, LI D X, CHEN S Y, BAI Q S, LI P. Effects of *Lactobacillus Brucei* and formic acid addition on fermentation quality and bacterial community of oat silage of different harvest stages in the Tibetan Plateau. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(6): 1736-1743.
- [34] 王晓娜, 孙国君, 孙建政, 库倩倩, 沈思军, 王旭哲. 种苜蓿混合青贮饲料品质比较研究. *动物营养学报*, 2023, 35(2): 1112-1122.
- WANG X N, SUN G J, SUN J Z, KU Q Q, SHEN S J, WANG X Z. Comparison study on quality of two kinds of alfalfa mixed silages. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(2): 1112-1122.
- [35] 张俊龙, 胡宏伟, 张成虎. 混合发酵对青贮饲料品质的影响. *草业科学*, 2023, 40(6): 1687-1694.
- ZHANG J L, HU H W, ZHANG C H. Effects of mixed fermentation on the quality of silage. *Pratacultural Science*, 2023, 40(6): 1687-1694.

(责任编辑 王芳)