

乳酸菌复合系 SFC-2 发酵液对秸秆饲料的抑菌作用

刘晶晶 宋成洁 刘晋欢 温博婷 王小芬 袁旭峰 崔宗均*

(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)

摘要 为揭示乳酸菌发酵液直接吸附生产秸秆饲料的新工艺中,发酵液对秸秆饲料的保鲜作用及其机制,以玉米秸秆为原料,以乳酸菌复合系 SFC-2 发酵液为处理剂,设不同添加量(0、75、150、375 mL/kg),研究吸附后 24 h 内秸秆的理化性质、微生物群动态变化及有氧稳定性。结果表明添加 SFC-2 发酵液后:1)提高秸秆的营养价值和风味,添加量越大,效果越明显;2)添加 75 mL/kg 时,秸秆的有氧稳定性提高,其余处理有氧稳定性降低;3)添加发酵液可以减少饲料有氧放置过程中粗蛋白的损失;4)变性梯度凝胶电泳(Denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)图谱分析表明,添加发酵液的处理中主导菌群是 SFC-2 中的 *Lactobacillus fermentum* 和 *L. plantum*,未发现对照中的杂菌条带。由此可见,添加适量 SFC-2 发酵液可通过有效抑制杂菌的繁殖,提高饲料的有氧稳定性等来实现保鲜作用。

关键词 乳酸菌复合系;发酵液;秸秆饲料;防腐作用

中图分类号 Q 939.99;S 963.4

文章编号 1007-4333(2015)04-0134-07

文献标志码 A

Antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 on straw feed

LIU Jing-jing, SONG Cheng-jie, LIU Jin-huan, WEN Bo-ting,

WANG Xiao-fen, YUAN Xu-feng, CUI Zong-jun*

(College of Agriculture and Biotechnology/Center of Biomass Engineering,

China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract A new straw feed producing process by applying lactic acid bacteria culture on the straw feed was proposed. In order to reveal the preservation effect of the bacteria culture on straw feed and mechanism involved, in this study, corn stalk was used as raw material, culture broth of lactic acid bacteria community SFC-2 was used as additive in different ratios (0, 75, 150, 375 mL/kg). By analyzing the physicochemical properties of straw and dynamic change of microorganisms in constant 24 hours after exposed to air, the results were as follows: 1) After adding lactic acid bacteria culture broth, smell and contents of water soluble carbohydrate (WSC) and crude protein (CP) were all improved, and these traits showed a positive correlation with the content of SFC-2 fermentation broth; 2) The aerobic stability of the straw feed was improved when 75 mL/kg was given, and decreased in other treatments; 3) Loss of crude protein was reduced when SFC-2 fermentation broth was given; 4) The band patterns of denaturing gradient gel electrophoresis revealed that strains of SFC-2 were the dominant species in the inoculated feedstuff, and many bands which appeared in the control were not detected in the inoculated feedstuff. In conclusion, by adding SFC-2 culture broth, some bacteria except SFC-2 were significantly restrained, and the aerobic stability of straw feed was improved.

Key words lactic acid bacteria community; culture broth; corn stalk; antiseptic effect

收稿日期: 2014-09-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD14B01)

第一作者: 刘晶晶, 博士研究生, E-mail: liujing85@cau.edu.cn

通讯作者: 崔宗均, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源转化与利用研究, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

随着畜牧业的不断发展,饲草饲料需求量逐年增加,秸秆饲料的开发利用可解决饲草的供给问题。玉米秸秆压块饲料由于营养全面、饲料报酬率高、便于储存和运输等优势,在反刍动物饲养中具有很可观的应用前景^[1]。秸秆压块饲料结构致密,在饲喂时需浸水使其变松散。在奶牛或肉牛养殖场中,为避免空槽综合征,必须保证饲槽中剩余的饲料粮占总饲料粮的5%~10%。在温热季节,秸秆吸水后暴露在空气下,杂菌迅速繁殖,若不及时清理或取食极易腐败变质,导致饲料品质下降;而且腐败变质的饲料易导致动物发生腹泻、肠炎等疾病,影响禽畜产品的品质。因此,饲喂过程中饲料的防腐处理应给予关注。

近年来,可直接饲喂微生物(Direct-fed microbial, DFM)对动物健康和生产性能的作用引起了人们的关注。乳酸菌是畜牧养殖业中常用的DFM,兼具抑菌和维持肠道内菌群平衡的功能,可以提高动物的生产性能,降低瘤胃酸中毒,增强免疫能力等^[2-5]。通常认为乳酸菌素的抑菌谱较窄,然而,不同的乳酸菌素具有不同的抑菌谱和抑菌活性,将不同种的乳酸菌制备成混合菌剂添加到饲料中,利用它们的协同作用可以增强抑菌范围及强度^[6]。戴兆来等^[7]研究表明混合乳酸菌的抑菌效果优于单菌,马静静等^[8]的研究也证实乳酸菌复合系SFC-2的发酵液具有广谱高效的抑菌效果。虽然乳酸菌的抑菌效果得到人们的一致性认可,但是在应用时由于环境和体系的复杂性以及使用剂量的不同会产生不同的效果^[9]。此外,饲喂时喷洒乳酸菌发酵液可以提高秸秆饲料的营养价值和风味。因此,研究饲喂时(暴露在空气中)添加乳酸菌发酵液对秸秆的抑菌作用具有重要意义。

本研究室提出一个生产秸秆饲料的新工艺,即通过大量乳酸菌发酵液直接吸附来提高秸秆的营养价值和风味,过程中发现乳酸菌发酵液对秸秆饲料具有保鲜作用,为揭示该作用机制,本研究以乳酸菌复合系SFC-2发酵液为处理剂,以玉米秸秆为原料,拟从营养学和分子生态学角度评估SFC-2发酵液吸附后秸秆的营养成分变化及发酵液对杂菌的抑制作用,旨在为饲喂工艺的改善提出理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米秸秆压缩块:单块平均密度250 g/cm³,含

水率约10.1%。

SFC-2发酵液:SFC-2主要由*Lactobacillus fermentum*、*L. plantum*和*L. paracasei*组成,在16srDNA的克隆文库中,分别占76.3%、20.3%和3.4%。甘油冷冻保存的菌种用MRS-S培养基(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, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.58 g/L, MnSO₄·4H₂O 0.25 g/L,吐温80 1 mL/L)活化并扩大培养,30℃静置培养24 h后备用。

1.2 方法

分别用含有5%、10%和15% SFC-2发酵液的自来水喷洒玉米秸秆压缩块,压缩块与混有发酵液的水的质量体积比为2:3,充分搅拌使压缩块松散。5%、10%和15% SFC-2发酵液在秸秆干物质(DM)的相应添加量分别为75、150和375 mL/kg,对照(CK)的水中不添加发酵液。各取700 g秸秆装入有盖的聚乙烯泡沫盒(24 cm×20 cm×16 cm),不压实、不密封,置于30℃恒温培养箱。分别于混合后的第0、3、6、9、12和24 h时取样,观察测定24 h内秸秆的气味、温度、pH、化学成分及微生物变化。

1.2.1 温度及pH的测定

温度测定利用热电偶原理,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。pH测定:取0.5 g(鲜质量)置于4.5 mL无菌水中,振荡后静置10 min,取浸出液0.2 mL滴于HORIBA微量pH计(model B-212, HORIBA, 日本)测定。

1.2.2 化学分析

可溶性碳水化合物(Water-soluble carbohydrates, WSC)测定:样品经60℃、48 h烘干后测定DM含量,干物质粉碎,过40目筛后,采用蒽酮比色法测定WSC含量^[10]。

粗蛋白(Crude protein, CP)测定:采用凯氏定氮法,参照美国官方分析化学师协会方法手册执行^[11]。

挥发性发酵产物的测定使用气质色谱(GC-MS, model QP. 5050, Shimadzu, 日本)。乳酸菌发酵液:8 000 r/min离心15 min,取上清液过0.22 μm水系滤膜。秸秆:取1 g,加2 mL去离子水,充分振荡静置后取浸提液,8 000 r/min离心15 min后取上清液过0.22 μm滤膜。分析柱:CP-

Chierasil-Dex CB型毛细管柱(25 m×0.25 mm);柱箱温度程序:60℃ 2 min后以5℃/min速度升至100℃,再以15℃/min速度升至190℃,保持2 min,共18 min;汽化温度:190℃;检测器温度:230℃;检测器电压:1.5 kV;载气:氦气(64 kPa);流量:30 mL/min;进样器为分流,分流比1/22,进样量为1 μL。

1.2.3 微生物分析

取5 g样品,加入45 mL Ringger's solution(氯化钠9 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^[12]。总DNA的提取使用Murray & Thompson拟定的CTAB法^[13]。提取的DNA质量需满足OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.6~2.0。

PCR扩增:用于变性梯度凝胶电泳(Denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)分析的PCR产物扩增区域为16S rDNA的V3区。采用引物为细菌通用引物对357F-GC和517R^[14]。50 μL反应体系包括:10×PCR Buffer 5 μL;2.5 mmol/L dNTP mix 4 μL;MgCl₂ 3 μL;45 μmol/L 357F-GC和517R各0.5 μL;0.2 μL Taq DNA聚合酶;模板DNA 10 ng。反应程序为95℃预变性10 min;93℃变性1 min,48℃退火1 min,72℃延伸1 min 10 s,30个循环;产物最终72℃延伸5 min。

DGGE:使用Dcode™ Universal Mutation Detector System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 美国)进行双变性梯度凝胶电泳。胶厚度1 mm,聚丙烯酰胺凝胶梯度为6%~12%,电泳缓冲液为0.5×TAE(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3,

10 mmol/L 乙酸,0.5 mmol/L EDTA),双变性梯度为20%~60%(40%甲酰胺,7 mol/L 尿素定为100%),电泳仪设定电压为200 V,电泳体系温度为61℃,电泳时间5 h。电泳结束后采用SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Ore.)染色,观察和照相采用AlphaImager 2200(Alpha Innotech, 美国)凝胶成像系统。具体步骤参照文献^[15]。

2 结果与分析

2.1 秸秆感官品质及化学成分变化

使用气质联机GC-MS分析SFC-2的24 h发酵产物,包括乙醇、乙酸、乳酸、甘油和二甘醇等,其中,乳酸、乙酸和乙醇占主导地位,浓度分别为11.98、4.69和3.19 mg/mL。如表1所示,玉米秸秆压块饲料自身具有特殊的焦香和糊香味,SFC-2发酵液具有酸香味,秸秆添加SFC-2发酵液后散发怡人的甘酸香味,且添加量越大,酸香味越重,随着暴露时间的延长,添加发酵液的秸秆逐渐散发水果酸香,质地不变;而未添加的秸秆逐渐散发腐败味,并略带粘性。结果表明,添加SFC-2发酵液可显著改善秸秆的适口性。

发酵液的pH值为3.8,且具有较强的缓冲能力。添加SFC-2发酵液后,由于发酵液的缓冲作用,秸秆初始pH下降。此外,培养24 h后,培养基中含有的蔗糖及蛋白胨、酵母浸粉和牛肉膏等营养物质不会被完全转化,乳酸菌发酵液中除乳酸菌及其代谢产物外,还含有丰富的营养物质。因此,添加乳酸菌发酵液可以提高秸秆饲料WSC和CP含量,从而提高秸秆饲料的营养价值。乳酸菌发酵液添加越多,秸秆pH越低,WSC和CP含量越高。

表1 吸附乳酸菌发酵液后秸秆的初始性质

Table 1 Smell and chemical composition of the corn stalk treated with different amount of lactic acid culture

处理 Treatment	气味 Odor	pH	可溶性糖/% WSC	粗蛋白/% CP
对照 CK	糊香味	7.1±0.1	3.50±0.03 a	7.10±0.22 a
5%	甘酸香	6.4±0.1	4.29±0.08 b	7.55±0.24 b
10%	甘酸香	6.2±0.1	4.32±0.02 b	7.74±0.16 b
15%	甘酸香	5.9±0.1	4.49±0.03 b	7.92±0.16 b

注:每列数字后相同字母表示在0.05水平上无显著差异,不同字母表示有显著差异。SFC-2发酵液在秸秆DM的相应添加量分别为:5%=75 mL/kg,10%=100 mL/kg,15%=375 mL/kg,下同。

Note: Values followed by the same letters in each column are not significantly different at 0.05 level from each other, and different letters are significantly different. 5%=75 mL/kg, 10%=100 mL/kg, 15%=375 mL/kg, the same as following figures.

如图 1(a)所示,随暴露时间的延长,秸秆中的 WSC 含量均呈下降趋势,但对照比添加发酵液的处理中 WSC 的损失率大。暴露 24 h,对照中 WSC 的损失率为 48.04%,添加量为 75、150、375 mL/kg 时秸秆中 WSC 的损失率分别为 37.58%、41.96%和 46.06%。WSC 是微生物首先利用的碳源,秸秆吸水暴露于空气后,腐败菌开始复苏,这些腐败菌分解利用秸秆中的 WSC 产生 CO₂;另一方面,部分乳酸

菌保持活性,发酵 WSC 产生乳酸、乙酸等挥发性产物,从而使 WSC 含量下降。

如图 1(b)所示,试验期间,对照中 CP 含量呈下降趋势,有氧暴露 24 h 损失 9.60%。添加乳酸菌发酵液的处理中 CP 变化虽然没有规律性,但 0~24 h 无显著差异($P>0.05$),说明添加 SFC-2 发酵液,可抑制秸秆中 CP 的损失。

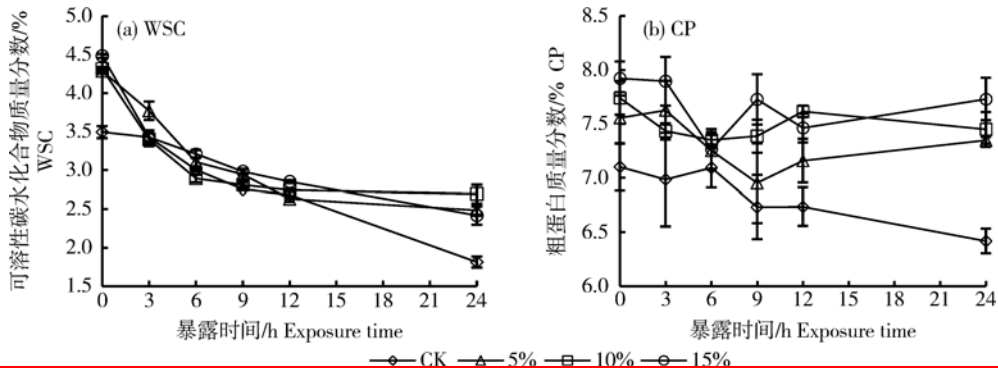


图 1 暴露空气 24 h 内不同处理秸秆中可溶性糖和粗蛋白质量分数

Fig.1 Content of WSC and CP of different treatments after aerobic exposure

2.2 秸秆堆温度的变化

图 2 为暴露 24 h 内秸秆核心温度的变化。青贮饲料有氧暴露后其核心温度比外界温度高出 2 °C 所需要的小时数被称为有氧稳定性^[12]。本研究用秸秆核心温度的变化来反映其有氧稳定性。如图所示,环境温度为 30 °C 时,对照的有氧稳定性为 11.5 h,5%、10%和 15%的有氧稳定性分别为 13.5、10.5 和 9.5 h。5%的有氧稳定性比对照好,10%和 15%比对照差。5%、10%和 15%的升温速度比 CK 快,且随着乳酸菌发酵液添加量的增加,升

温速度加快,10%和 15%的温度及变化趋势基本一致。各处理的最高温度 CK>10%=15%>5%。各处理在达到最高温度后呈现出不同的变化趋势。CK 在 15 h 达到 40.5 °C 后逐渐下降,5%、10%和 15%分别在 14.5、16 和 16 h 达到 32.6、34.2 和 33.8 °C 后保持稳定。

2.3 秸秆 pH 的动态变化

图 3 为添加不同量 SFC-2 发酵液的秸秆在暴露空气 24 h 内 pH 的变化。如图 3 所示,添加 SFC-2 发酵液可以降低秸秆的初始 pH,添加量越大,pH

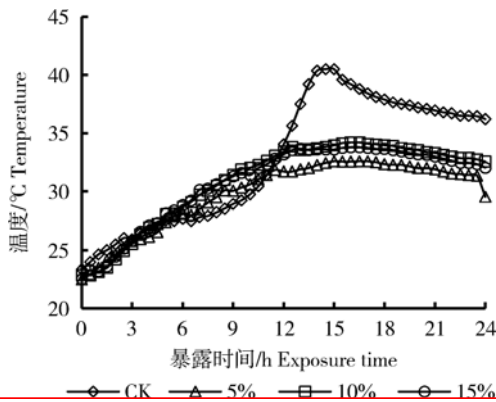


图 2 暴露空气 24 h 内不同处理秸秆的温度

Fig.2 Temperature of different treatments after aerobic exposure

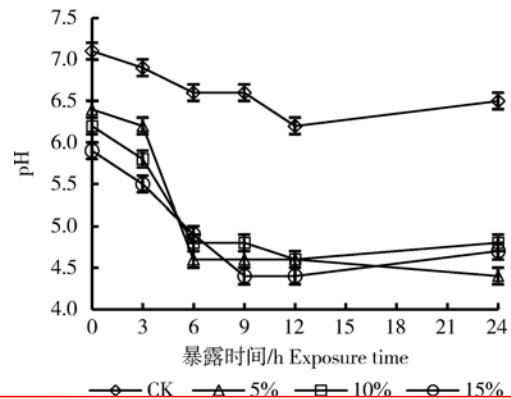


图 3 暴露空气 24 h 内不同处理秸秆的 pH

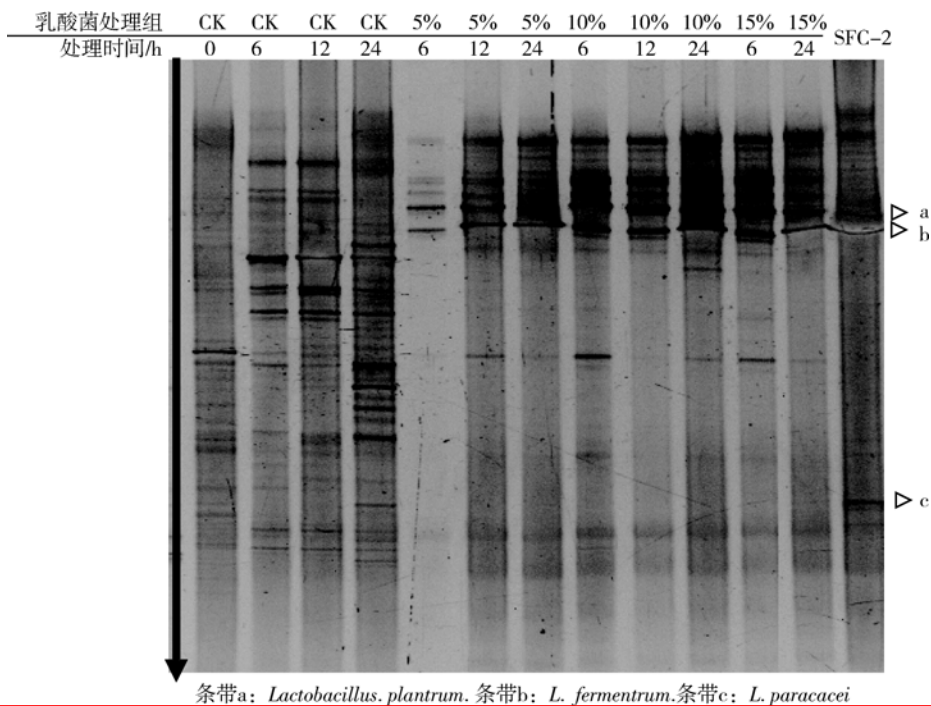
Fig.3 pH of different treatments after aerobic exposure

越低。在开始的 12 h 内,4 个处理的秸秆 pH 均有下降的趋势,但 CK 变化较缓慢,第 12 h 时,pH 分别为 6.2、4.6、4.6 和 4.4。但到第 24 h 时,CK、10%、15% 的 pH 分别升高至 6.8、4.8、4.7,而 5% 的 pH 继续下降至 4.4。结果表明,添加 SFC-2 发酵液不仅可以降低秸秆初始 pH,而且可以促使秸秆在有氧暴露的 24 h 内 pH 下降。

2.4 秸秆中细菌菌群的动态变化

对吸水后 24 h 内不同处理秸秆中的细菌菌群

变化进行 PCR-DGGE 分析。如图 4 所示,CK 中细菌条带丰富,且随放置时间的延长,丰富度增加;添加乳酸菌的处理中细菌条带较少,SFC-2 中的 *L. plantarum* 和 *L. fermentum* 是优势菌群;不同添加量之间的细菌菌群多样性没有明显差异。结果表明,乳酸菌发酵液对秸秆中的大部分细菌起到抑制作用。这一结果与马静静等^[8]证实的结果一致,即 SFC-2 的发酵液对秸秆自然发酵体系中的部分杂菌具有显著的抑菌活性。



Band a: *Lactobacillus plantarum*. Band b: *L. fermentum*. Band c: *L. paracacei*

图 4 不同处理细菌群动态变化的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 4 PCR-DGGE profiles the dynamics of bacterial populations in different treatments

3 讨论

pH 可以保证青贮饲料在保存的过程中性质稳定^[16]。一般细菌适宜生长的 pH 条件在 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^[17-18],而 *L. fermentum* 和 *L. plantarum* 等乳酸杆菌在 pH 3.0~4.5 条件下仍有较高的存活率^[19-21]。如表 1 和图 3 所示,CK 的 pH 值始终在 6.0 以上;添加乳酸菌发酵液降低秸秆的 pH 值,并在有氧暴露后继续下降至 5.0 以下。SFC-2 中 *L. fermentum* 和 *L. plantarum* 分别占 76.3% 和 20.3%,在此条件下仍能存活并生长,消耗秸秆中的

可溶性糖(图 2(a))产酸,并导致 pH 下降,使一般细菌很难生长。此外,在制约乳酸菌生存生长的诸多胁迫因素中,氧胁迫有着较为特殊的地位。暴露在氧环境中势必将增加乳酸菌所遭受的氧胁迫,导致乳酸菌菌株生长速度减缓、提前进入衰亡期等一系列问题^[22]。较低的 pH 增强发酵菌株所承受的氧胁迫。由所测得的温度、pH、WSC 的数据分析,在暴露到空气中 12 h 之后,曲线的变化基本平缓,说明乳酸菌的生长受到抑制。

如图 3 所示,有氧暴露后,5%、10% 和 15% 的 pH 急剧下降。pH 的变化反映了有氧暴露后秸秆饲料里有机酸的积累情况。李楠^[23]对养殖场的空

气采样分析说明,空气中主要的细菌为科氏葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、腐生葡萄球菌、芽孢杆菌、大肠埃希菌等,而这些细菌无法产生有机酸。因此推断,有氧暴露后 pH 持续下降主要是体系中的乳酸菌继续代谢产酸所致。乳酸菌利用秸秆中的 WSC 大量繁殖,使得秸秆中 WSC 含量降低,产酸使 pH 下降。由于秸秆自身附着的乳酸菌数量极少,WSC 含量较低,乳酸菌不是优势菌,所以暴露初期,对照 CK 中 pH 下降缓慢,而添加菌液的处理中,pH 值快速下降。好氧微生物分解乳酸和残余的 WSC 产生 CO₂,同时也会分解蛋白质和氨基酸产生氨或胺类物质^[24],导致暴露后期 pH 值的升高。

如图 4 所示,有氧暴露后 5%、10%和 15%中的优势菌群始终为 SFC-2 中的 *L. fermentum* 和 *L. plantarum*,杂菌条带不明显,进一步证明乳酸菌发酵液的抑菌作用。腐败菌分解蛋白质和氨基酸产生氨或胺类物质,造成 CP 的损失,而乳酸菌作为一种益生菌能够将秸秆中的可溶性成分转化为菌体蛋白,部分抵消腐败菌消耗的蛋白质。因此如图 1(b)所示,5%、10%和 15%中粗蛋白的变化不显著($P > 0.05$),有氧暴露 24 h,CK 中 CP 损失 9.60%。

如图 4 所示,5%、10%和 15%这 3 个处理的抑菌效果没有显著差异,但是添加量越大,WSC 损失越多,有氧稳定性越差。如图 2 所示,在 30 °C 的环境下,5%的有氧稳定性比 10%和 15%的好。温度的升高主要是耗氧微生物呼吸作用产生大量的热导致的^[25]。乳酸菌通常被认为属于兼性厌氧微生物,但在有氧情况下,如果环境中存在血红素(或同时存在甲基萘醌),部分乳酸菌能够启动呼吸链,进入有氧呼吸的生理状态^[26]。本研究中,通过 PCR-DGGE 结果显示,3 个处理中腐败菌的生长均受到抑制,但 5%与 10%和 15%比较,有氧稳定性却表现出显著差异,原因有待于进一步深入研究。

乳酸菌的抑菌效果是多种因素共同作用的结果,其代谢产物酸、过氧化氢及细菌素或抗生素类物质都具有抑菌活性^[27]。马静静等^[8]研究证明 SFC-2 发酵上清液具有抑菌作用,抑菌因子包括有机酸和对蛋白酶敏感的组分。综上所述,添加乳酸菌发酵液后,低的 pH、有机酸和细菌素极大地抑制其他腐生菌的生长,降低 CP 的损失,不仅实现对饲料的防腐,还改善秸秆饲料的风味,提高适口性。此外,乳酸菌作为主要的 DFM 可以增加饲养场肉牛的日常增重和饲料转化效率,提高奶牛的产奶量,并能够降

低瘤胃酸中毒的发病率、提高犊牛的免疫力。

4 结 论

添加乳酸菌复合系 SFC-2 发酵液可以提高秸秆的营养价值;同时还可以产生有机酸等风味物质改善秸秆的适口性,并减少 CP 的损失。添加量为 75 mL/kg 时,秸秆饲料的有氧稳定性提高。乳酸菌发酵液通过抑制杂菌的生长,实现对秸秆饲料的保鲜作用。

参 考 文 献

- [1] 宋中界,连萌,王威立,等. 秸秆压块饲料技术及前景分析[J]. 农机化研究,2008(2):15-18
- [2] Krehbiel C R, Rust S R, Zhang G, et al. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action[J]. J AnimSci,2003,81(S2):E120-E132
- [3] Stephens T P, Stanford K, Rode L M, et al. Effect of a direct-fed microbial on animal performance, carcass characteristics and the shedding of *Escherichia coli* O157 by feedlot cattle[J]. Anim Feed Sci Tech,2010,158(1):65-72
- [4] Seo J K, Kim S, Kim M H, et al. Direct-fed microbials for ruminant animals [J]. Asian-Australas J AnimSci, 2010, 23 (12):1657-1667
- [5] Novak K N, Davis E, Wehnes C A, et al. Effect of supplementation with an electrolyte containing a *Bacillus*-based direct-fed microbial on immune development in dairy calves[J]. Res Vet Sci,2012,92(3):427-434
- [6] 田晓乐,孟庆繁,周杰,等. 微生物防腐剂:细菌素的研究与应用 [J]. 食品工业科技,2004,25(1):120-123
- [7] 戴兆来,董红军,林勇,等. 合生元组合筛选及对仔猪生产性能和腹泻的影响[J]. 南京农业大学学报,2008,31(2):81-85
- [8] 马静静,王小芬,高丽娟,等. 秸秆发酵中乳酸菌复合系 SFC-2 对杂菌的抑制作用[J]. 微生物学报,2008,48(7):879-886
- [9] 王晶,许丽. 乳酸菌抑菌机理及其在鸡生产上的应用[J]. 饲料博览,2009(9):11-13
- [10] Arthur Thomas T. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage[J]. J Sci Food Agr,1977,28(7):639-642
- [11] Horwitz W. Official methods of analysis of the AOAC[M]. Volume 2. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists Inc,1990
- [12] Ranjit N K, Taylor C C, Kung Jr L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage[J]. Grass Forage Sci,2002,57 (2):73-81
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res,1980,8(19):4321-4326

- [14] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microb*, 1993, 59(3):695-700
- [15] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解[J]. *中国农业大学学报*, 2006, 11(5):1-7
- [16] Wang J, Wang J Q, Zhou H, et al. Effects of addition of previously fermented juice prepared from alfalfa on fermentation quality and protein degradation of alfalfa silage[J]. *Anim Feed Sci Tech*, 2009, 151(3):280-290
- [17] 王成章, 陈桂荣. 饲料生产学[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1998
- [18] 陈世化, 夏延斌, 聂乾忠. 发酵蔬菜中乳酸菌抑菌性的研究[J]. *食品工程*, 2007(2):6-9
- [10] 胡学智, 王俊. 益生菌饲料的现状, 生产和应用效果(一)[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(9):861-864
- [20] 张秀红, 刘婷婷. 具广谱抑菌活性乳酸菌的筛选[J]. *乳业科学与技术*, 2010, 33(2):56-59
- [21] 于平, 汪晓辉. 降胆固醇植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 的生理生化特性[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(7):7-13
- [22] 付龙云. 乳酸菌抗氧胁迫及有氧生长的研究[D]. 济南:山东大学, 2013
- [23] 李楠. 养殖场空气中细菌分布及耐药性研究[D]. 长春:中国人民解放军军事医学科学院, 2011
- [24] Seale 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 Forage Sci*, 1986, 41(1):61-70
- [25] Woolford M K. The detrimental effects of air on silage[J]. *J Appl Microbiol*, 1990, 68(2):101-116
- [26] Murphy M G, Condon S. Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures[J]. *Arch Microbiol*, 1984, 138(1):44-48
- [27] 田召芳, 常维山, 唐珂心, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选及体外抑菌试验[J]. *中国微生态学杂志*, 2003, 15(2):87-88

责任编辑:袁文业