

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1291 - 1297; 4 October 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140548

青藏高原乳酸菌对垂穗披碱草青贮饲料发酵品质的影响

张红梅¹, 柯文灿², 荆佩欣², 张娟², 陈明², 于应文¹, 郭旭生^{2*}

¹兰州大学草地农业科技学院草地农业生态系统国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000

²兰州大学生命科学学院草地农业生态系统国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: 【目的】为了探究青藏高原乳酸菌对垂穗披碱草发酵品质的影响。【方法】本试验将3株从青藏高原垂穗披碱草 (*Elymus nutans* Griseb.) 中筛选的耐低温乳酸菌(戊糖片球菌 PP-6, 植物乳杆菌 LP-2 和清酒乳杆菌 LS-5) 作为添加剂加入垂穗披碱草进行青贮, 同时对其生理生化特性进行研究, 并以低海拔条件下分离得到的相同菌种的商品化乳酸菌制剂为对照, 研究所筛选的3株优良乳酸菌在低温(15℃)和常温条件(25℃)下对垂穗披碱草青贮饲料发酵品质的影响。【结果】试验结果表明, 在碳源利用方面, 分离得到的戊糖片球菌 PP-6 (*Pediococcus pentosaceus*) 发酵棉子糖、乳糖、山梨醇、蜜二糖和蔗糖, 清酒乳杆菌 LS-5 (*Lactobacillus sakei*) 可发酵棉子糖、苦杏仁苷、鼠李糖、乳糖、山梨醇、木糖、阿拉伯糖、蜜二糖和蔗糖, 而相同菌种的商品菌均不能利用, 表明高原乳酸菌具有更广泛的糖源利用特性。将筛选得到的3株低温生长优良菌株进行青藏高原垂穗披碱草青贮发酵试验, 青贮50 d后, 与对照的商品菌处理相比, 在15℃时, 清酒乳杆菌 LS-5 显著降低了青贮饲料 pH 值、丙酸含量和氨态氮/全氮值 ($P < 0.05$), 且能够保存更多的水溶性碳水化合物和粗蛋白; 植物乳杆菌 LP-2 (*Lactobacillus plantarum*) 和戊糖片球菌 PP-6 作为复合添加剂显著提高了青贮饲料乳酸含量 ($P < 0.05$), 显著降低了氨态氮/全氮值和中性洗涤纤维含量 ($P < 0.05$), 能够保存更多的粗蛋白。但在25℃时, 此3株菌与对照菌种相比均无明显优势。【结论】上述结果表明, 从青藏高原分离筛选的3株菌种在低温条件下可有效提高青藏高原垂穗披碱草青贮饲料的发酵品质。

关键词: 乳酸菌, 青贮, 低温发酵, 垂穗披碱草, 青藏高原

中图分类号: Q935 文章编号: 0001-6209(2015)10-1291-07

青藏高原独特的环境因素, 使传统的商品化乳酸菌添加剂在青藏高原地区的应用受到了一定的限制。越来越多的学者希望能发掘青藏高原本土乳酸菌的特异性, 并将其应用于当地的生产生活中。如热杰、原现军和 Yuan 分别对青藏高原燕麦 (*Avena sativa*)、多年生黑麦草和青稞秸秆青贮品质进行了评价, 发现青藏高原牧草青贮饲料色绿、酸香味浓、

适口性好、有氧稳定性高, 揭示青藏高原地区乳酸菌可能存在特异性^[1-3]。本课题组杨杨和高静对青藏高原藏高草 (*Koeleria tibetica*) 表面附着乳酸菌进行分离筛选, 并发现由于长期生存在青藏高原特殊的环境中, 高原地区乳酸菌具有更广泛的糖源利用特性^[4-5], 但尚未有学者对青藏高原乳酸菌在低温条件下对牧草青贮发酵品质进行评价。

基金项目: 国家自然科学基金(31272486)

* 通信作者。E-mail: guoxsh07@lzu.edu.cn

作者简介: 张红梅(1990-), 女, 甘肃古浪县人, 研究方向为饲草加工及青藏高原乳酸菌发酵性能研究。E-mail: zhanghm13@lzu.cn

收稿日期: 2014-11-20; 修回日期: 2015-05-11

垂穗披碱草是一种青藏高原较常见的多年生禾本科牧草,它具有丰富的营养价值,适口性较好,是青藏高原地区可供家畜采食的典型优良牧草之一^[6-7]。因此本研究以垂穗披碱草为青贮原料,以筛选出的在低温条件下生长较好的乳酸菌为添加剂进行青贮,然后探究乳酸菌在低温条件下对牧草青贮品质的影响,以期发掘适合青藏高原高寒地区牧草青贮的乳酸菌菌种和青藏高原特殊环境条件下调制优质青贮饲料提供菌种资源和理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料的概况与试验材料

青贮原料为甘肃省天祝藏族自治县金强河地区(37°11′—7°13′N,102°23′—102°29′E,海拔2964 m)种植的垂穗披碱草,在初花期(2013年7月16日)收割。试验菌株为本课题组从青藏高原垂穗披碱草青贮饲料中分离并通过低温生长和发酵试验分离得到的戊糖片球菌 PP-6,植物乳杆菌 LP-2 和清酒乳杆菌 LS-5。相应的参考菌株为购自中国工业微生物网(CICC)并分离自低海拔地区青贮饲料中的戊糖片球菌 C-PP(编号:CICC22734),植物乳杆菌 C-LP(编号:CICC21864)和清酒乳杆菌 C-LS(编号:CICC21858),以及从商品化乳酸菌制剂 CNR Stage II(Vita Plus Corporation,美国)分离得到的植物乳杆菌 A-LP 和戊糖片球菌 A-PP。以上总共 8 个菌种供以下实验。

1.2 乳酸菌生理生化特性测定

1.2.1 糖发酵、精氨酸产氨、硝酸盐还原和葡萄糖产气:用 MRS 液体培养基活化以上 8 个菌种,将活化的菌液接入 MRS 固体培养基^[4]中,在 37 °C 培养箱中培养 2-3 d,用接种环挑取菌落于糖发酵、精氨酸产氨、硝酸盐还原和葡萄糖产气微量生化反应管中,设置两个对照,接种后放入 37 °C 培养箱中厌氧培养 48-72 h 后,观察其变色反应。

1.2.2 不同温度和 pH 值生长特性的测定:用 MRS 液体培养基活化菌种,接种后放入 37 °C 培养箱中厌氧培养 12 h 后,在无菌环境中稀释使乳酸菌数量至 10^8 CFU/mL,按 3% 的比例将乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中,并分别置于 4、10、45、50 °C 培养,其中 4、10 °C 培养 7 d,45、50 °C 培养 4 d,在 600 nm 处测定 OD 值。于 pH3.0、3.5、4.0、8.0、8.5、9.0 的 MRS

培养液中分别接入菌株且培养 7 d,于 600 nm 处测定其 OD 值。以上实验均设置 2 个对照。以 $OD < 0.05$ 记为不生长, $0.05 < OD < 0.1$ 记为微弱生长, $0.1 < OD < 0.5$ 记为生长, $OD > 0.5$ 记为生长良好。

1.3 乳酸菌添加青贮制作

本实验中乳酸菌添加青贮制作分两组,一组为实验筛选得到的清酒乳杆菌 LS-5 与其对应的购自中国工业微生物网(CICC)的标准菌 C-LS 作为添加剂进行青贮发酵。另一组为戊糖片球菌 PP-6,植物乳杆菌 LP-2 作为混合添加剂进行青贮发酵,对应的标准菌株为购自中国工业微生物网(CICC)的戊糖片球菌 C-PP 和植物乳杆菌 C-LP 以及从美国乳酸菌制剂分离得到的植物乳杆菌 A-LP 和戊糖片球菌 A-PP,对应菌株分别作为混合添加剂进行青贮发酵实验。

采集垂穗披碱草,切短至 2 cm 左右后混匀,室温自然风干 24 h 左右,获取含水量为 65%–70% 的青贮原料,称取 200 g,分别按 10^6 CFU/g FM 的接种量喷洒乳酸菌菌液,混匀后装入(30 cm × 23 cm)的聚乙烯袋中,用真空包装机将其抽真空并封口,分别于 15 °C 和 25 °C 恒温培养箱中进行青贮,青贮 50 d 后开启,取样分析青贮料发酵品质和化学成分。

1.4 青贮品质与化学成分的测定

取青贮原料和样品各 10 g,加入 90 mL 去离子水并搅拌均匀,用组织捣碎机将其搅碎 1 min,然后用 4 层纱布过滤,滤出草渣得到的浸出液放入 -20 °C 条件下保存,用于 pH 值、氨态氮、乳酸、乙酸、丙酸和丁酸、水溶性碳水化合物的测定。用 pH 计测定青贮料浸出液 pH 值;乳酸、乙酸、丙酸和丁酸含量用 SHIMADZE-10A 型高效液相色谱仪分析,色谱柱:ShodexRspak KC-811S-DVB gel Column 300 mm × 8 mm,检测器:SPD-M10AVP,流动相:3 mmol/L 高氯酸,流速:1 mL/min,进样量:5 μL,柱温:50 °C,检测波长:210 nm^[8];氨态氮含量采用苯酚-次氯酸钠比色法测定^[9];水溶性碳水化合物含量用蒽酮-硫酸比色法测定^[10]。剩余的青贮样品各自混匀后置于 65 °C 鼓风干燥箱中烘干 48 h 左右直至恒重,测定其水分含量,烘干样品用微型植物样粉碎机粉碎后过 40 目筛用于干物质、粗蛋白、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量的测定。干物质含量用 105 °C 烘干法测定^[11];粗蛋白含量用 Tecator 1030 型凯氏定氮仪蒸馏测定^[12];中性洗涤纤维和酸性洗

涤纶含量用范氏洗涤纤维法测定^[13]。

1.5 数据统计与分析

基础数据利用 Excel 软件处理并制作图表, 用 SPSS 软件进行方差分析与 Duncan 多重比较。

2 结果

2.1 试验菌株和参考菌株的生理生化特性比较

从表1可以看出, 参考菌株和本课题组从青藏

表 1. 不同菌株生理生化特性比较

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of different strains

Strains	LP	C-LP	A-LP	PP	C-PP	A-PP	LS	C-LS
Source	Lab	CICC	USA.	Lab	CICC	USA.	Lab	CICC
Cell shape	rod	rod	rod	coccoid	coccoid	coccoid	rod	rod
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ O ₂ Enzyme reaction	—	—	—	—	—	—	—	—
Fermentation type	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
T/ °C								
4	W	W	W	+	+	W	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
45	++	++	++	++	++	++	++	++
50	W	W	W	W	+	+	W	+
pH								
3.0	W	W	W	W	W	W	—	—
3.5	W	W	W	W	W	W	W	W
4.0	++	++	+	+	+	+	W	+
8.0	++	++	++	++	++	++	++	++
8.5	++	++	++	++	++	++	++	++
9.0	W	+	+	++	++	++	++	++
Fermentation substrate								
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose, pure	+	—	—	+	—	—	+	—
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrilosides	+	+	+	+	+	+	+	—
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	W	+	—	—	+	—
Esculin hydrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	w	—	+	+	—	—	+	—
Xylose	+	+	+	+	—	+	+	—
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	—	—	+	+	—
Glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	w	—	—	+	—
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	—	+	+	—	—	—	+	—
Melibiose	+	+	+	+	—	—	+	—
Salicin	+	+	+	+	+	+	—	+
Amylum	—	—	—	—	—	—	—	—
Sucrose	+	+	+	+	—	—	+	—
Gluconate	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine ammonia production	—	—	—	—	+	+	—	+
Nitrate reduction	—	—	—	—	—	—	—	—

+, ++, +, w, — indicate growing better ($OD > 0.5$), growing ($0.1 < OD < 0.5$), growing slightly ($0.05 < OD < 0.1$), none growing ($OD < 0.05$) respectively; LP, PP, LS stand for *L. plantarum*-2, *P. pentosaceus*-6, *L. sakei*-5, respectively; C and A stand for the strain bought from China Center of Industrial Culture Collection and American, respectively, the same below.

高原分离得到的试验菌株在糖发酵特性方面呈现较大差异。试验菌株植物乳杆菌 LP-2 发酵棉子糖但不发酵鼠李糖,而参考菌株 A-LP、C-LP 则发酵鼠李糖但不发酵棉子糖;试验菌株戊糖片球菌 PP-6 发酵棉子糖、乳糖、山梨醇、蜜二糖和蔗糖但不发酵鼠李糖,而参考菌株 C-PP 和 A-PP 则呈现出相反的变化,只有 A-PP 利用阿拉伯糖,而 PP-6 和 C-PP 则均不利用阿拉伯糖;试验菌株清酒乳杆菌 LS-5 可利用棉子糖、苦杏仁苷、鼠李糖、乳糖、山梨醇、木糖、阿拉

伯糖、蜜二糖和蔗糖,而参考菌株 C-LS 则均不利用。

在不同温度和 pH 值环境下,对不同菌株的生长 OD 进行测定发现,在 50 °C 时,实验室分离的 LS-5 只有微弱生长,而 C-LS 生长较好;LS-5 与 C-LS 在 pH 值为 3 时不生长,而其余菌株均有微弱生长。

2.2 垂穗披碱草青贮原料特性

表 2 可以看出,垂穗披碱草青贮前原料水分含量在 70% 左右,水溶性碳水化合物含量为 5.27%,基本满足了良好青贮的水分含量要求。

表 2. 青贮前垂穗披碱草原料化学成分

Table 2. Chemical composition of *Elymus nutans* before ensilage

Dry matter (% FM)	Crude protein (% DM)	Water soluble carbohydrate (% DM)	Neutral detergent fiber (% DM)	Acid detergent fiber (% DM)
29.67	8.30	5.27	63.29	28.02

FM means fresh matter, DM means dry matter, the same below.

从表 3 和 4 可以看出,在 15 °C 时,本课题组分离的试验菌株清酒乳杆菌 LS 与参考菌株 C-LS 相比能显著降低青贮料 pH 值、丙酸含量和氨态氮/全氮值 ($P < 0.05$),且能够保存更多的水溶性碳水化合物和粗蛋白;在 25 °C 时,pH 值差异不显著,但本课题

组分离的清酒乳杆菌 LS 与参考菌株 C-LS 相比,显著提高了青贮饲料乳酸含量 ($P < 0.05$),且氨态氮/全氮值显著低于参考菌株 C-LS 处理组 ($P < 0.05$),显著降低了青贮料中性洗涤纤维含量 ($P < 0.05$)。

表 3. 添加试验菌株清酒乳杆菌 LS-5 和参考菌株 C-LS 后垂穗披碱草青贮品质比较

Table 3. Comparison of fermentation quality of *Elymus nutans* silage inoculated with LS-5 or C-LS

Strains	pH		Lactic acid (% DM)		Acetic acid (% DM)		Propionic acid (% DM)		AN/TN (% TN)	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
LS	4.42	4.52	6.51	7.33*	1.24	1.77*	1.11	2.07	16.81	12.14
CLS	4.53*	4.56	7.85*	5.37	1.40	1.38	1.39*	1.85	19.73*	21.78*

TN means total nitrogen. * show significant differences at $P < 0.05$, the same below.

表 4. 添加试验菌株清酒乳杆菌 LS-5 和参考菌株 C-LS 后垂穗披碱草青贮饲料化学成分比较

Table 4. Comparison of chemical composition of *Elymus nutans* silage inoculated with LS-5 or C-LS

Strains	Water soluble carbohydrate (% DM)		Crude protein (% DM)		Neutral detergent fiber (% DM)		Acid detergent fiber (% DM)	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
LS	1.39*	0.91	7.77	7.08	59.84	58.99	28.03	29.63
C-LS	1.06	0.99	7.28	7.24	58.75	62.51*	28.16	30.11

青贮 50 d 后,所有处理青贮饲料水溶性碳水化合物含量均减少。从表 5 和 6 可以看出,在 25 °C 时,青贮饲料中剩余的水溶性碳水化合物含量占青贮原料的 17% 左右,粗蛋白含量也低于青贮原料。试验菌株混合制剂 LP + PP 与参考菌株相比,在

15 °C 下显著增加了青贮饲料乳酸含量 ($P < 0.05$),且高于 25 °C 处理,有较低的氨态氮/全氮值,能够保存更多的粗蛋白,显著降低了青贮料中性洗涤纤维含量 ($P < 0.05$)。

表 5. 添加试验菌与参考菌植物乳杆菌与戊糖片球菌混合制剂后垂穗披碱草青贮饲料发酵品质比较

Table 5. Comparison of fermentation quality of *Elymus nutans* silage inoculated with LP + PP

Strains	pH		Lactic acid (% DM)		Acetic acid (% DM)		Propionic acid (% DM)		AN/TN (% TN)	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
	LP + PP	4.69 b	4.66a	7.08a	5.73b	1.63ab	2.00	1.43	2.34ab	21.76b
C-LP + PP	4.76a	4.60b	5.76b	5.27c	1.55b	1.86	1.36	2.53a	25.59a	17.33b
A-LP + PP	4.60b	4.53c	5.87b	6.24a	1.88a	1.86	1.42	2.27b	20.18a	16.13b

Values followed by different letters in the same column show significant differences at 0.05 level. LP + PP, mixed strains of *L. plantarum*-2, *P. pentosaceus*-6; C-LP + PP and A-LP + PP, mixed strains of *L. plantarum* and *P. pentosaceus* that were bought from CICC and a silage inoculants cooperation of USA. The same below.

表 6. 添加试验菌与参考菌植物乳杆菌与戊糖片球菌混合制剂后垂穗披碱草青贮饲料化学成分比较

Table 6. Comparison of chemical composition of *Elymus nutans* silage inoculated with LP + PP

Strains	Water soluble carbohydrate (% DM)		Crude protein (% DM)		Neutral detergent fiber (% DM)		Acid detergent fiber (% DM)	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
	LP + PP	0.87b	1.01	7.30a	7.07	58.46b	61.80b	30.05
CLP + CPP	1.01b	1.01	6.65b	7.23	59.44ab	64.26a	29.73	30.01a
ALP + APP	1.42a	1.16	7.19a	7.28	60.49a	63.08ab	28.58	27.81b

3 讨论

3.1 添加筛选乳酸菌对垂穗披碱草青贮品质的影响

3.1.1 清酒乳杆菌 LS-5 对垂穗披碱草青贮品质的影响:在前人的研究中,清酒乳杆菌多用作发酵香肠的发酵剂,它可赋予香肠良好的风味和品质,并且绝大多数清酒乳杆菌细菌素对致病菌单核增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)具有较强的抑制作用^[14]。本试验首次将清酒乳杆菌添加至牧草中进行低温青贮,试验发现与同种商品菌相比,清酒乳杆菌 LS-5 能显著降低青贮饲料 pH 值($P < 0.05$),抑制腐败微生物的繁殖,使青贮料中丙酸含量较低,且有较低的氨态氮/全氮值。这可能因为本课题组分离菌株长期生活在低温环境下、对低温有一定适应性,从而其青贮性能优于一般环境中的乳酸菌。

由于青贮体系中微生物的活动消耗了牧草中的水溶性碳水化合物,青贮后水溶性碳水化合物含量显著降低,与管武太等研究结果相一致^[15]。但从青藏高原分离的清酒乳杆菌 LS-5 与同种商品菌相比,pH 值的降低抑制了腐败菌对水溶性碳水化合物的利用,使其青贮饲料中水溶性糖含量显著高于 C-LS 处理。植物蛋白酶自身的分解,丁酸菌与肠道菌的作用,使青贮料中粗蛋白含量降低^[16]。添加从青藏高原分离的清酒乳杆菌 LS-5 可使青贮饲料有较低的 pH 值,抑制了微生物对蛋白的分解,使青贮饲料能够保存更多的蛋白。中性洗涤纤维含量占垂穗披

碱草干物质含量的 63.29%,一般较难分解。在青贮饲料中一般通过添加纤维素酶,加大植物细胞壁的分解,降低中性洗涤纤维含量,提供更多的碳水化合物以促进发酵^[17]。本研究发现,从青藏高原分离得到的清酒乳杆菌 LS-5 在降低青贮料中性洗涤纤维含量方面有一定的优势。中性洗涤纤维含量下降,将不仅仅改善牧草的营养价值,也对提高家畜生产性能有一定的益处^[18]。

3.1.2 植物乳杆菌 LP-2 + 戊糖片球菌 PP-6 复合添加剂对垂穗披碱草青贮品质的影响:乳酸菌是促使牧草发酵的主要有益微生物,但一般牧草表面附着乳酸菌数量不足 10^5 CFU/g,为了使青贮饲料 pH 值迅速下降,并维持稳定的状态,一般采取向青贮原料中添加乳酸菌的方式提高青贮品质。目前研究最多的是将乳杆菌与片球菌相结合,作为复合菌株添加至青贮原料中以提高牧草发酵品质。如 Sebastian 等和 Lindgren 等将植物乳杆菌与戊糖片球菌结合用于青贮试验中,发现混合乳酸菌添加剂显著提高了牧草青贮品质^[16,19]。一方面戊糖片球菌在青贮初期可迅速降低 pH 值,抑制腐败菌的生长,另一方面植物乳杆菌耐酸性较好,在青贮后期弥补了乳酸菌数量逐渐减少的问题^[20]。本试验也发现,在低温条件下(15 °C),从青藏高原分离的植物乳杆菌与戊糖片球菌作为复合添加剂可使青贮饲料中乳酸含量达 7.08% (DM),与同种商品菌相比显著增加了青贮料乳酸含量,抑制了腐败微生物对蛋白的分解,从而保存更多的粗蛋白,这可能与青藏高原乳酸菌对低温有一定适应性有关。

4 结论

相对于常规条件下分离得到的商品化乳酸菌菌种,从青藏高原垂穗披碱草青贮饲料中分离并筛选得到的低温发酵高原乳酸菌菌种清酒乳杆菌 LS-5、戊糖片球菌 PP-6 和植物乳杆菌 LP-2 在 15 °C 下能有效提高垂穗披碱草青贮品质和营养价值。从青藏高原青贮饲料中分离得到的乡土乳酸菌菌种更适应在青藏高原的低温条件下调制优质青贮饲料。而且,与普通商品化乳酸菌菌种相比,从青藏高原特殊条件下分离得到的高原乳酸菌菌种可利用更多的碳源作为其发酵底物。

参考文献

- [1] Re J. Effects of lactobacillus additives on silage quality of Qinghai-Tibet Plateau oats. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(32): 15846-15847. (in Chinese)
热杰. 乳酸菌添加剂对青藏高原燕麦青贮品质的影响. *安徽农业科学*, 2009, 37(32): 15846-15847.
- [2] Yuan XJ, Yu CQ, Li ZH, Shimojo M, Shao T. A study on fermentation quality of mixed silages of hullless barley straw and perennial ryegrass in Tibet. *Acta Prataculturae Sinica*, 2012, 21(4): 325-330. (in Chinese)
原现军, 余成群, 李志华, 下条雅敬, 邵涛. 西藏青稞秸秆与多年生黑麦草混合青贮发酵品质的研究. *草业学报*, 2012, 21(4): 325-330.
- [3] Yuan XJ, Yu CQ, Shimojo M, Shao T. Improvement of fermentation and nutritive quality of straw-grass silage by inclusion of wet hullless-barley distillers' grains in Tibet. *Asian-Australia Journal of Animal Sciences*, 2012, 25(4): 479-485.
- [4] Gao J, Guo XS, Wang GC. Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Kobresia littledalei* in Tibet. *Pratacultural Science*, 2013, 30(8): 1266-1271. (in Chinese)
高静, 郭旭生, 王国成. 西藏地区藏嵩草附着乳酸菌的理化特性研究. *草业科学*, 2013, 30(8): 1266-1271.
- [5] 杨杨. 西藏地区藏嵩草附着乳酸菌的分离、鉴定及理化特性研究. 兰州大学硕士学位论文, 2012.
- [6] Cheng XY, Hou Y, Ren GH, Deng B, Zhao JX, Shang ZH. Allelopathic effects of aqueous extracts from "Black Soil Patch" poisonous weeds on *Elymus nutans* in degraded alpine meadow. *Acta Botanica Boreall-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(10): 2057-2064. (in Chinese)
程晓月, 后源, 任国华, 邓斌, 赵景学, 尚占环. "黑土滩"退化高寒草地 6 种常见毒杂草水浸液对垂穗披碱草的化感作用. *西北植物学报*, 2011, 31(10): 2057-2064.
- [7] Yan XB, Wang X, Guo YX, Zhou H, Zhang DG. Biomass and feeding value dynamics of *Elymus nutans* pasture in cold alpine pastoral areas. *Pratacultural Science*, 2003, 20(11): 14-18. (in Chinese)
严学兵, 汪玺, 郭玉霞, 周禾, 张德罡. 高寒牧区垂穗披碱草草地生物量及营养价值动态的研究. *草业科学*, 2003, 20(11): 14-18.
- [8] Tao L, Yu Z. The dynamics of *Ceratoides arborescens* fermentation quality in the process of ensiling. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(6): 122-127. (in Chinese)
陶莲, 玉柱. 华北驼绒藜青贮贮藏过程中发酵品质的动态变化. *草业学报*, 2009, 18(6): 122-127.
- [9] Broderica GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 1980, 63(1): 64-75.
- [10] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [11] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [12] Krishnamoorthu U, Muscato TV, Sniffen CJ, Van Soest PJ. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(2): 217-225.
- [13] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [14] Jiang J, Shi B, Fang JQ, Chen XL, Qi KZ, Zhang M. Current advances and prospects of researches on the bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei*. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(3): 268-271. (in Chinese)
姜洁, 施波, 方佳琪, 陈晓琳, 祁克宗, 张明. 清酒乳杆菌细菌素研究的现状及展望. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(3): 268-271.
- [15] Guan WT, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG. Effects of microbial inoculants applied to sorghum at ensiling on silage characteristics and aerobic stability. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(11): 1401-1405. (in Chinese)
管武太, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG. 微生物添加剂对青贮高粱发酵品质和稳定性的影响. *中国农业科学*, 2002, 35(11): 1401-1405.

- [16] Lindgren S, Pettersson K, Jonsson A, Lingvall P, Kaspersson A. Silage inoculation-selected strains, temperatures, wilting and practical application. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 1985, 15 (1) : 9-18.
- [17] Zhu Y, Nishion N, Kishida Y, Uchida S. Ensiling characteristics and ruminal degradation of Italian ryegrass and *Lucerne silages* treated with cell wall-degrading enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79 (14) : 1987-1992.
- [18] Yang ZG, Sheng YQ, Chen AQ. Application of cellulolytic enzyme in silage. *Feed Review*, 2002 (1) : 39-41. (in Chinese)
- 杨志刚, 沈益新, 陈阿琴. 纤维素酶在青贮饲料中的应用. *饲料博览*, 2002 (1) : 39-41.
- [19] Sebastian S, Phillip LE, Fellner V, Idziak ES. Comparative assessment of bacterial inoculated corn and sorghum silages. *Journal of Animal Science*, 1996, 71 : 505-514.
- [20] Saarisoalo E, Skyttä E, Haikara A, Jaakkola S. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102 (2) : 327-336.

Effect of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Plateau on silage fermentation quality of *Elms nutans*

Hongmei Zhang¹, Wencan Ke², Peixin Jing², Juan Zhang², Ming Chen², Yingwen Yu¹, Xusheng Guo^{2*}

¹State Key Laboratory of Grassland and Agro-Ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

²State Key Laboratory of Grassland and Agro-Ecosystems, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] In order to detect the effect of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Plateau on silage fermentation quality of *Elms nutans*. [Methods] We used 3 isolated lactic acid bacteria with better growth at low temperatures of 10 and 15 °C at ensiling of *Elymus nutans*. Subsequently, effects of the selected lactic acid bacteria on fermentation profiles of *Elymus nutans* silages stored at 15 and 25 °C were evaluated by using the same species of commercial inoculants as the control. [Results] PP-6 isolated from Tibetan Plateau could ferment raffinose, lactose, sorbitol, melibiose and sucrose, and LS-5 could ferment cottonseed sugar, laetrile, rhamnase, lactose, sorbitol, xylose, arabinose, melibiose and sucrose, but the same species of commercial strains could not use these sugars. Inoculation of these three strains into *Elymus nutans* at 15 and 25 °C ensiled for 50 d, we found that LS-5 significantly reduced silage pH, propionic acid concentration and ratio of ammonia nitrogen/total nitrogen at 15 °C ($P < 0.05$), salvaged more water-soluble carbohydrate and crude protein; Application of LP-2 and PP-6 as a combined inoculant to *Elymus nutans* significantly improved lactic acid concentration ($P < 0.05$), resulting in a lower ratio of ammonia nitrogen/total nitrogen, saved more crude protein and significantly reduced neutral detergent fiber content ($P < 0.05$) as compared with the commercial strains. [Conclusion] The three isolated strains can improve silage quality of *Elymus nutans* growing on the Qinghai-Tibetan Plateau at low temperature, but these strains have no obvious advantages at 25 °C in comparison with the commercial inoculants.

Keywords: lactic acid bacteria, silage, low temperature fermentation, *Elymus nutans*, the Qinghai-Tibetan Plateau

(本文责编: 张晓丽)