

DOI:10.11686/cyxb2024295

http://cyxb.magtech.com.cn

王思然, 丁成龙, 田吉鹏, 等. 乳酸菌和抗真菌添加剂对湿啤酒糟全混合日粮青贮发酵品质、体外消化率及有氧稳定性的影响. 草业学报, 2025, 34(6): 213—226.

WANG Si-ran, DING Cheng-long, TIAN Ji-peng, *et al.* Effects of biological and antifungal additives on ensiling characteristics, *in vitro* digestibility, gas production, and aerobic stability of fermented total mixed ration including wet brewers' grains. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(6): 213—226.

乳酸菌和抗真菌添加剂对湿啤酒糟全混合日粮青贮发酵品质、体外消化率及有氧稳定性的影响

王思然^{1,2}, 丁成龙^{1,2}, 田吉鹏^{1,2}, 程云辉^{1,2}, 许能祥^{1,2}, 张文洁^{1,2}, 王欣^{1,2}, 刘蓓一^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2. 农业农村部种养殖结合重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要:湿啤酒糟是一种产量庞大且富含粗蛋白、维生素和矿物质等营养物质的工业副产物,但其含水量高不易保存,严重限制其应用于反刍动物养殖。为此,本试验旨在评价乳酸菌及抗真菌添加剂对湿啤酒糟全混合日粮(TMR)青贮发酵品质、体外消化率及有氧稳定性的影响。试验设对照组(control)、干酪乳杆菌组[LC, 1×10^6 cfu·g⁻¹ 鲜重(FW)]、布氏乳杆菌组(LB, 1×10^6 cfu·g⁻¹ FW)、山梨酸钾组(POS, 1 g·kg⁻¹ FW)、双乙酸钠组(SOD, 5 g·kg⁻¹ FW)和丙酸钙组(CAP, 5 g·kg⁻¹ FW)6个处理。青贮100 d后全部开窖(20 L),取样分析发酵品质、化学成分及微生物数量,同时将剩余TMR有氧暴露,分别在第6、9和14天取样分析,评价其有氧稳定性。结果表明,青贮100 d后,各组TMR发酵品质良好,具有较低的pH值(4.32~4.47)、丁酸[0.837~1.750 g·kg⁻¹ 干重(DM)]及氨态氮(76.7~91.8 g·kg⁻¹ 全氮)含量。对照、LB、POS和SOD组有氧稳定性均较好,其中POS组在有氧暴露第14天时具有更低的好氧菌(5.50 vs. 6.56~7.66 log₁₀ cfu·g⁻¹ FW)和霉菌数量(4.93 vs. 4.96~5.91 log₁₀ cfu·g⁻¹ FW)。相较于对照组,POS组和CAP组均提高了体外干物质消化率(62.5%、65.4% vs. 55.3%)和体外中性洗涤纤维消化率(56.3%、59.1% vs. 48.2%)。综合考虑,在生产湿啤酒糟(100 g·kg⁻¹ FW)发酵TMR饲料时可添加1 g·kg⁻¹ FW的山梨酸钾,既能改善有氧稳定性,还能提高体外消化率。

关键词:乳酸菌;抗真菌添加剂;全混合日粮;发酵品质;有氧稳定性

Effects of biological and antifungal additives on ensiling characteristics, *in vitro* digestibility, gas production, and aerobic stability of fermented total mixed ration including wet brewers' grains

WANG Si-ran^{1,2}, DING Cheng-long^{1,2}, TIAN Ji-peng^{1,2}, CHENG Yun-hui^{1,2}, XU Neng-xiang^{1,2}, ZHANG Wen-jie^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, LIU Bei-yi^{1,2*}

1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory for Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China

Abstract: Wet brewers' grain (WBG) is an industrial by-product that is produced in large quantities, and is rich in nutrients, including crude proteins, vitamins, and minerals. However, the high water content makes it challenging to preserve WBG, and this severely limits its use in ruminant farming. Hence, the aim of this study was to

收稿日期:2024-07-23;改回日期:2024-09-12

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(32301500),江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2023]398),农业农村部种养殖结合重点实验室开放课题基金(202303)和江苏省大型科学仪器开放共享自主研究课题资助。

作者简介:王思然(1992—),男,新疆哈密人,助理研究员,博士。E-mail: wangsirana@jaas.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: byliu@jaas.ac.cn

investigate the effects of biological and antifungal additives on the fermentation quality, *in vitro* digestibility, and aerobic stability of fermented total mixed ration (TMR) containing WBG at a concentration of $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ fresh weight (FW). The TMR was ensiled in 20-L silos with six treatments: 1) no additives (Control); 2) *Lactocaseibacillus casei* (LC; applied at $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW); 3) *Lentilactobacillus buchneri* (LB; $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW); 4) potassium sorbate (POS; $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW); 5) sodium diacetate (SOD; $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW); and 6) calcium propionate (CAP; $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW). All silos were opened after 100 days of ensiling to evaluate the fermentation quality and *in vitro* digestibility of the silages, followed by a 14-day aerobic stability test. All the TMR silages were well-preserved with low pH ($4.32-4.47$) and acceptable levels of butyric acid ($0.837-1.750 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry matter) and ammonia nitrogen ($76.7-91.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ total nitrogen). The control, LB, POS, and SOD silages remained stable during the 14-day aerobic stability test, and the POS silage was the most stable. Compared with the other silages, the POS silage had smaller populations of aerobic bacteria ($5.50 \text{ vs. } 6.56-7.66 \log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW) and mold ($4.93 \text{ vs. } 4.96-5.91 \log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW) on day 14 of the aerobic stability test. The POS and CAP silages showed increased *in vitro* digestibility of dry matter ($62.5\%-65.4\% \text{ vs. } 55.3\%$ in the control) and neutral detergent fiber ($56.3\%-59.1\% \text{ vs. } 48.2\%$ in the control). Overall, POS (applied at $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW) is recommended as an additive to improve the fermentation quality, aerobic stability, and *in vitro* digestibility of fermented TMR containing $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW WBG.

Key words: lactic acid bacteria; antifungal additives; total mixed ration; fermentation quality; aerobic stability

全混合日粮(total mixed ration, TMR)含有精料、粗饲料、矿物质和维生素等原料,具有各营养物质比例平衡的特点,可满足动物生长需求,目前已被广泛用于饲喂反刍动物^[1]。将TMR饲料置于密闭厌氧环境中进行长时间青贮发酵,即可制成发酵TMR饲料(fermented TMR, FTMR)^[2]。与传统TMR饲料相比,制备发酵TMR饲料时对大型机械(TMR搅拌机等)和人力的依赖较少,发酵后可中和原料中的难闻气味,同时在贮藏期间仍可保持各营养成分均一^[3]。湿啤酒糟(wet brewers' grains, WBG)富含粗蛋白、维生素和矿物质等营养物质,是啤酒工业生产中的副产物^[4]。中国每年生产的湿啤酒糟超过1000万t,湿啤酒糟的生产成本低廉^[5]。若对湿啤酒糟进行人工干燥处理,会大幅增加生产成本,且湿啤酒糟的利用存在一定季节性。因此,将湿啤酒糟开发为可长期贮存的发酵TMR饲料原料是一种较好的加工利用方式。但湿啤酒糟水分含量高且易变质,为此,需要添加一些乳酸菌及抗真菌添加剂来改善湿啤酒糟TMR青贮饲料的发酵品质。

近年来,多种青贮添加剂已被开发用于改善青贮饲料的发酵品质和有氧稳定性^[6]。Nishino等^[7]研究发现,添加干酪乳杆菌(*Lactocaseibacillus casei*, LC)能有效降低青贮饲料中的生物胺含量。Kleinschmit等^[8]发现添加布氏乳杆菌(*Lentilactobacillus buchneri*, LB)可明显提高全株玉米(*Zea mays*)青贮饲料的有氧稳定性。然而,乳酸菌接种剂的活性高度依赖于饲料原料的特性和环境条件^[9],因此,化学添加剂通常比乳酸菌接种剂发挥得更加稳定^[10]。山梨酸钾(potassium sorbate, POS)和双乙酸钠(sodium diacetate, SOD)是具有抗真菌特性的有机酸盐类添加剂。山梨酸钾凭借其抗菌活性已被添加应用在全株玉米青贮饲料中,防止其发生有氧腐败^[11]。Knický等^[12]发现,山梨酸钾能有效抑制酵母、霉菌和梭菌的生长。双乙酸钠易解离形成乙酸,因此可在青贮过程中抑制有害微生物的活性^[13]。Okur等^[14]也发现,添加双乙酸钠可有效改善全株玉米青贮饲料的有氧稳定性。丙酸钙(calcium propionate, CAP)是食品及饲料防腐剂中的主要成分,能有效抑制霉菌和其他微生物^[15]。目前关于乳酸菌接种剂和抗真菌添加剂对湿啤酒糟发酵TMR饲料品质、有氧稳定性及体外消化率的影响尚不清楚。

本试验旨在研究干酪乳杆菌、布氏乳杆菌、山梨酸钾、双乙酸钠和丙酸钙对湿啤酒糟TMR青贮发酵品质、有氧稳定性和体外消化率的影响,为扩大粗饲料来源、降低饲料成本、生产优质发酵TMR饲料提供理论依据和技术支撑,促进当地养殖业可持续发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验设计

全混合日粮由湿啤酒糟、全株燕麦(*Avena sativa*,收获于乳熟期)、精料、箭筈豌豆(*Vicia sativa*,收获于结荚期)和青稞(*Hordeum vulgare* var. *coeleste*)秸秆(收获籽实后剩余部分)配制而成。箭筈豌豆、燕麦和青稞均种植于西藏日喀则地区草原工作站试验地(29. 27° N, 88. 88° E),材料草于2023年7月25日刈割。精料主要含200 g·kg⁻¹鲜重(fresh weight, FW)菜籽粕、75 g·kg⁻¹ FW玉米粉、275 g·kg⁻¹ FW玉米酒糟(distillers dried grains with soluble, DDGS)、200 g·kg⁻¹ FW小麦(*Triticum aestivum*)麸、200 g·kg⁻¹ FW全棉(*Gossypium hirsutum*)籽、50 g·kg⁻¹ FW维生素矿物质。全株燕麦、箭筈豌豆和青稞秸秆均被铡刀切成10~20 mm长度,按照试验设计与精料充分混匀。全混合日粮饲料中各原料的化学成分如表1所示。青贮前全混合日粮中各原料组成、微生物数量及化学成分如表2所示。

表 1 全混合日粮中原料的化学成分
Table 1 Chemical compositions of ingredients used in total mixed ration

项目 Items	湿啤酒糟 Wet brewers' grain	箭筈豌豆 Common vetch	全株燕麦 Whole-crop oat	青稞秸秆 Hulless barley straw	精料* Mixed concentrate*
干物质 Dry matter (g·kg ⁻¹ FW)	231	281	514	969	911
粗蛋白 Crude protein (g·kg ⁻¹ DM)	284	181	93	43	151
中性洗涤纤维 aNDFom (g·kg ⁻¹ DM)	393	476	367	600	178
酸性洗涤纤维 ADFom (g·kg ⁻¹ DM)	140	74	176	117	161
粗脂肪 Ether extract (g·kg ⁻¹ DM)	108	70	85	59	56
粗灰分 Ash (g·kg ⁻¹ DM)	139	71	51	65	107
水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates (g·kg ⁻¹ DM)	68	81	150	42	105
缓冲能 Buffering capacity (mEq·kg ⁻¹ DM)	144	325	181	44	173
非纤维性碳水化合物 Non-fibrous carbohydrate (g·kg ⁻¹ DM)	76	202	404	234	508

注: FW:鲜重;DM:干物质;mEq:mg当量;aNDFom:中性洗涤纤维(添加热稳定性淀粉酶,不含粗灰分);ADFom:酸性洗涤纤维(不含粗灰分)。*精料含200 g·kg⁻¹ FW菜籽粕、75 g·kg⁻¹ FW玉米粉、275 g·kg⁻¹ FW玉米酒糟、200 g·kg⁻¹ FW全棉籽、50 g·kg⁻¹ FW维生素矿物质和200 g·kg⁻¹ FW小麦麸。下同。
Note: FW: Fresh weight; DM: Dry matter; mEq: Milligram equivalent; aNDFom: Neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash; ADFom: Acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash. *Mixed concentrate includes 200 g·kg⁻¹ FW rape cake meal, 75 g·kg⁻¹ FW crack corn, 275 g·kg⁻¹ FW distillers dried grains with soluble (DDGS), 200 g·kg⁻¹ FW cotton seed, 50 g·kg⁻¹ FW vitamin-mineral, and 200 g·kg⁻¹ FW wheat bran. The same below.

试验采用完全随机设计,设对照组(control,添加等量去离子水)、干酪乳杆菌组(LC,添加1×10⁶ cfu·g⁻¹ FW)、布氏乳杆菌组(LB,添加1×10⁶ cfu·g⁻¹ FW)、山梨酸钾组(POS,添加1 g·kg⁻¹ FW,食品级添加剂,纯度98%,购于中国宁波王龙科技有限公司)、双乙酸钠组(SOD,添加5 g·kg⁻¹ FW,食品级添加剂,纯度99%,购于中国锦州吉荣氨基酸有限公司)和丙酸钙组(CAP,5 g·kg⁻¹ FW,食品级添加剂,纯度99%,购于中国南通奥凯生物科技发展有限公司)。每组设6个青贮密封桶作重复(每个塑料青贮桶容积为20 L,圆柱状,有内外盖,密封性良好)。接种前,将乳酸菌菌株在MRS(deMan, Rogosa and Sharp)液体培养基(10 g蛋白胨、5 g牛肉粉、4 g酵母粉、2 g葡萄糖、1 mL吐温-80、2 g磷酸氢二钾、5 g乙酸钠、2 g柠檬酸三铵、0.2 g硫酸镁、0.05 g硫酸锰、1000 mL蒸馏水)(购于上海百维科技有限公司)中进行培养,当布氏乳杆菌和干酪乳杆菌均达到目标接种浓度1×10⁶ cfu·g⁻¹ FW后在TMR中进行接种。将乳酸菌接种剂与去离子水混合后,利用手动喷壶将乳酸菌接种剂均匀喷洒在TMR上,并持续搅拌5 min。用去离子水对化学添加剂进行稀释,每kg(FW)TMR原料上用手动喷壶喷洒10 mL

化学添加剂稀释液。在对照组中喷洒等量去离子水。每个青贮桶中可装入约 9 kg FW 的 TMR 原料,压实密度可达约 250 kg 干物质(dry matter, DM)·m⁻³。共计 36 个青贮桶(6 个处理×6 个重复),室温(20~24 °C)下密封保存 100 d(2023 年 8—11 月)。

青贮 100 d 后,开启青贮桶,将每个桶表面上方约 3 cm 厚的 TMR 饲料丢弃。随后将每个桶中剩余的饲料倒在干净塑料膜上充分混匀后取样。每个桶中取约 1 kg FW 的发酵 TMR 饲料用于分析发酵品质和微生物计数。留下约 3 kg FW 的发酵 TMR 饲料进行有氧稳定性评估。

将约 3 kg FW 的 TMR 青贮饲料无压实装填至 10 L 的敞口无菌塑料桶中,桶口用双层纱布包裹,防止环境污染和水分散失,空气可自由进入桶中,置于室温(环境温度为 18~22 °C)下有氧暴露 14 d。每个处理设 6 个重复,分别在有氧暴露 0、6、9 和 14 d 后取样分析 pH、氨态氮、有机酸、水溶性碳水化合物含量和微生物数量的动态变化。若青贮饲料中 pH 值比初始 pH 值(有氧暴露第 0 天时)升高 0.5 即可判定发生了有氧腐败^[16]。

1.2 化学与微生物成分分析

分别对 TMR 原料和青贮前后的发酵 TMR 饲料进行取样分析。将第一份子样品(20.0 g FW)与 100 mL 去离子水混合并打碎成匀浆,经双层无菌纱布过滤后得到滤液,保存于-20 °C 冰箱,用于测定发酵品质。使用 pH 计(S400-K,瑞士苏黎世梅特勒—托莱多公司)测定样品 pH 值。采用氢氧化钠—盐酸滴定法测定新鲜原料的缓冲能(buffering capacity)^[17]。使用高效液相色谱法[安捷伦 1260 型高效液相检测系统,配备示差检测器;流动相为 2.5 mmol·L⁻¹ 硫酸溶液,流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 55 °C;色谱柱采用 Carbomix H-NP 柱(型号 260508-7830),购自苏州赛分科技股份有限公司]测定样品中的乙醇及有机酸(乳酸、乙酸、丙酸、丁酸)含量^[5]。采用次氯酸—苯酚比色法测定样品中的氨态氮(ammonia nitrogen, NH₃-N)含量^[18]。依据 Conaghan 等^[19]的方法对青贮饲料发酵品质进行评价。挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs)为乙酸、丙酸和丁酸含量的总和。发酵终产物(fermented products, FP)为乳酸(lactic acid, LA)、乙酸、丙酸、丁酸(butyric acid, BA)和乙醇含量的总和。乳酸浓度以乳酸含量与发酵终产物的比值(LA:FP)表示。青贮饲料品质可分为极差(LA:FP≤50%,BA≥25 g·kg⁻¹ DM)、差(LA:FP≤50%,BA<25 g·kg⁻¹ DM)、中(LA:FP 为 50%~60%)、好(LA:FP 为 61%~70%)、优(LA:FP>70%)5 个等级。

将第二份子样品(150 g FW)在 65 °C 下烘干 48 h 至恒重。随后用小型饲料粉碎机(型号 SFSP999,中鼎饲料机械生产有限公司)粉碎,过 1 mm 筛网(型号 FW100,泰斯特仪器有限公司)后用于测定样品的营养成分。采用硫酸—蒽酮比色法测定样品中水溶性碳水化合物(water soluble carbohydrate, WSC)含量^[20]。参照美国公职分析化学协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)^[21]的方法分别对酸性洗涤纤维(不含粗灰分)(acid

表 2 青贮前全混合日粮中各原料组成、化学成分和微生物数量
Table 2 Ingredient proportions, chemical compositions and microbial populations of total mixed ration before ensiling

项目 Items	全混合日粮 Total mixed ration
原料构成 Ingredient proportions	
湿啤酒糟 Wet brewers' grain (g·kg ⁻¹ FW)	100
箭筈豌豆 Common vetch (g·kg ⁻¹ FW)	350
全株燕麦 Whole-crop oat (g·kg ⁻¹ FW)	150
青裸秸秆 Hulless barley straw (g·kg ⁻¹ FW)	100
精料 Mixed concentrate (g·kg ⁻¹ FW)	300
化学成分 Chemical compositions	
干物质 Dry matter (g·kg ⁻¹ FW)	569
粗蛋白 Crude protein (g·kg ⁻¹ DM)	155
水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate (g·kg ⁻¹ DM)	93.0
中性洗涤纤维 aNDFom (g·kg ⁻¹ DM)	374
酸性洗涤纤维 ADFom (g·kg ⁻¹ DM)	126
粗脂肪 Ether extract (g·kg ⁻¹ DM)	70.7
粗灰分 Ash (g·kg ⁻¹ DM)	84.8
非纤维性碳水化合物 Non-fibrous carbohydrate (g·kg ⁻¹ DM)	315
缓冲能 Buffering capacity (mEq·kg ⁻¹ DM)	212
微生物数量 Microbial populations	
乳酸菌 Lactic acid bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	4.83
好氧菌 Aerobic bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	6.54
酵母菌 Yeasts (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	6.28
霉菌 Molds (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	5.15

注: Log₁₀: 十进制对数; cfu: 菌落形成单位。下同。

Note: Log₁₀: Decimal logarithm; cfu: Colony-forming units. The same below.

detergent fiber expressed exclusive of residual ash, ADFom)、干物质(DM)、粗脂肪(ether extract, EE)、粗灰分(ash)和粗蛋白(crude protein, CP)含量进行测定。根据 Van Soest 等^[22]的方法测定中性洗涤纤维(添加热稳定性淀粉醇, 不含粗灰分)(neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash, aNDFom)含量, 测定时加入了耐高温 α 淀粉酶。非纤维性碳水化合物(non-fibrous carbohydrate, NFC)含量依据美国国家研究理事会(National Research Council, NRC)^[23]公布的肉牛营养需要公式计算($NFC=1000-CP-aNDFom-EE-Ash$)。

参考 Wang 等^[5]的方法, 取第3份子样品(10.0 g FW), 与 90 mL 无菌生理盐水(0.85% NaCl)在 200 mL 锥形瓶中混合, 置于水平摇床振荡 2 h(速度 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。振荡结束后, 从锥形瓶中吸取 1 mL 液体进行梯度稀释, 用于乳酸菌、好氧菌、霉菌和酵母菌计数。乳酸菌采用 MRS(deMan, Rogosa, Sharpe)琼脂培养基(10 g 蛋白胨、5 g 牛肉粉、4 g 酵母粉、2 g 葡萄糖、1 mL 吐温-80、2 g 磷酸氢二钾、5 g 乙酸钠、2 g 柠檬酸三铵、0.2 g 硫酸镁、0.05 g 硫酸锰、15 g 琼脂、1000 mL 蒸馏水)在 37°C 厌氧培养箱中培养 3 d。好氧菌采用营养琼脂培养基(nutrient agar; 10 g 蛋白胨、3 g 牛肉膏、5 g 氯化钠、15~20 g 琼脂、1000 mL 蒸馏水)培养, 霉菌和酵母菌采用马铃薯(*Solanum tuberosum*)葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar; 200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、15~20 g 琼脂、1000 mL 蒸馏水)培养, 好氧菌、霉菌和酵母菌均在 37°C 生化培养箱中培养 3 d, 培养基均购自上海盛思生化科技有限公司。

1.3 体外产气及消化试验

根据 Menke 等^[24]的方法测定发酵 TMR 饲料样品的体外消化率及产气量(gas production, GP)。选取 5 只健康成年波尔公山羊(平均初始体重为 99.7 kg)作为瘤胃液供体, 试验期间在早晨 7:30 和傍晚 5:30 分别饲喂含有 45%(DM)商品精料和 55%(DM)粗饲料(由 50% 燕麦干草和 5% 箭筈豌豆干草组成)的基础饲粮, 保证自由饮水。在晨饲前 2 h 收集山羊瘤胃液, 经 4 层粗纱布过滤挤压至血清瓶(128 mL)中, 血清瓶中含有预热过的(39°C)缓冲液[瘤胃液:缓冲液=1:2(体积比), 共 50 mL]和烘干后的饲料样品(1 g DM), 并持续用 CO_2 冲洗。在 39°C 的水浴摇床中培养 72 h, 每组 3 个重复, 分别在 2、4、8、12、24、36、48 和 72 h 时记录产生的气体体积(mL)。利用烘干草粉样品测定干物质消化率(*in vitro* dry matter digestibility, IVDMD)和中性洗涤纤维消化率(*in vitro* neutral detergent fiber degradability, IVNDFD)^[5], 计算公式分别如下:

$$\text{IVDMD}(\%) = 100 \times [\text{发酵前底物重(g)} - \text{发酵后残留底物重(g)}] / \text{发酵前底物重(g)}$$

$$\text{IVNDFD}(\%) = 100 \times [\text{发酵前底物 NDF 含量(g)} - \text{发酵后残留底物 NDF 含量(g)}] / \text{发酵前底物 NDF 含量(g)}$$

根据以下动态发酵模型, 利用 SAS 软件计算体外动态产气参数^[5], 计算公式如下:

$$Y = b \times (1 - e^{-ct})$$

式中: Y 代表 t 时间点 1 g 发酵底物的产气量(mL); b 代表 1 g 发酵底物 72 h 理论最大产气量(mL); c 代表产气速率($\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$); t 代表体外发酵时间(h)。

1.4 数据处理与统计分析

在评价 TMR 青贮饲料发酵品质和体外消化率及产气的试验中, 采用完全随机试验设计, 共设 6 个处理, 每个处理 6 个重复。使用 SPSS(13.0)软件进行统计分析。采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)对 TMR 饲料的发酵品质及体外产气和消化率数据进行分析:

$$Y_i = \mu + T_i + e_{ij}$$

式中: μ 为最小二乘平均值; Y_i 为因变量($i=1, 2, 3, 4, 5, 6$); e_{ij} 为残差项; T_i 为青贮添加剂处理。

在有氧暴露期间, 试验采用完全随机设计, 设有 6 种青贮添加剂和 4 个有氧暴露时间点, 每个处理 6 个重复。根据 6 种青贮添加剂和 4 个有氧暴露时间点, 为 6×4 因子试验设计, 对样品化学成分及微生物数量进行双因素方差分析(two-way ANOVA), 使用 SPSS(13.0)软件分析:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + (T \times D)_{ij} + e_{ij}$$

式中: Y_{ij} 为因变量; μ 为总体均值; T_i 为青贮添加剂处理($i=1, 2, 3, 4, 5, 6$); D_j 是有氧暴露时间点($j=1, 2, 3, 4$);

$(T \times D)_{ij}$ 为青贮添加剂与有氧暴露时间点的交互作用; e_{ij} 是残差项。采用多项式正交对比(线性及二次)来评估不同处理下有氧暴露时间对发酵TMR饲料化学及微生物成分的影响。

采用 Tukey 方法对处理间及有氧暴露天数间数据进行多重比较,采用平均值和均值标准误 (standard error of the mean, SEM)表示结果数据, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 TMR 饲料发酵品质、化学成分及微生物数量

各青贮添加剂均显著($P < 0.01$)影响 TMR 饲料发酵品质、化学成分和微生物数量(表3)。青贮 100 d 后,LC

表3 发酵 100 d 后全混合日粮饲料的发酵品质、化学成分和微生物数量

Table 3 Fermentation quality, chemical compositions and microbial populations of fermented total mixed ration after 100 days of fermentation

项目 Items	处理 Treatments						标准误	P 值
	Control	LC	LB	POS	SOD	CAP	SEM	P value
发酵特性 Fermentation characteristics								
pH	4.47a	4.32d	4.34cd	4.37c	4.45a	4.41b	0.014	<0.001
乳酸 Lactic acid (LA, g·kg ⁻¹ DM)	99.2b	112.4a	86.4e	90.4d	86.9de	95.2c	2.193	<0.001
乙酸 Acetic acid (g·kg ⁻¹ DM)	13.79b	13.63b	12.94b	12.47b	19.21a	9.47c	0.719	<0.001
乳酸/乙酸 Lactic acid/acetic acid	7.22bc	8.28b	6.69c	7.26bc	4.53d	10.10a	0.418	<0.001
丙酸 Propionic acid (g·kg ⁻¹ DM)	2.95cd	3.30bc	3.44b	2.46e	2.51de	8.32a	0.496	<0.001
丁酸 Butyric acid (g·kg ⁻¹ DM)	0.837c	1.716a	1.748a	1.612ab	1.465b	1.512ab	0.076	<0.001
挥发性脂肪酸 VFAs (g·kg ⁻¹ DM)	17.6bc	18.6bc	18.1bc	16.5c	23.2a	19.3b	0.536	<0.001
乙醇 Ethanol (g·kg ⁻¹ DM)	11.14a	1.24c	2.06c	3.48b	3.32b	3.14b	0.794	<0.001
乳酸:发酵产物 LA:FP (%)	77.6c	85.0a	81.1b	81.9b	76.6c	80.9b	0.682	<0.001
水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates (g·kg ⁻¹ DM)	35.8de	34.4e	41.8c	45.9b	38.6cd	52.5a	1.535	<0.001
氨态氮 NH ₃ -N (g·kg ⁻¹ total nitrogen)	86.3ab	91.8a	90.9a	88.6ab	76.7c	83.5b	1.298	<0.001
化学成分 Chemical compositions								
干物质 Dry matter (DM, g·kg ⁻¹ FW)	546a	519c	514c	548a	550a	540b	3.476	<0.001
粗蛋白 Crude protein (CP, g·kg ⁻¹ DM)	144ab	142ab	146a	140b	142ab	146a	0.578	0.004
粗灰分 Ash (g·kg ⁻¹ DM)	66.4c	75.2ab	77.4a	72.2b	76.2a	78.0a	0.996	<0.001
粗脂肪 Ether extract (g·kg ⁻¹ DM)	72.2b	69.6b	76.0a	71.6b	77.0a	78.6a	0.819	<0.001
中性洗涤纤维 aNDFom (g·kg ⁻¹ DM)	484b	499a	446c	495ab	494ab	494ab	4.474	<0.001
酸性洗涤纤维 ADFom (g·kg ⁻¹ DM)	128.0a	97.0c	117.7ab	118.3ab	108.7bc	110.7bc	2.576	<0.001
非纤维性碳水化合物 Non-fibrous carbohydrate (g·kg ⁻¹ DM)	167a	139bc	177a	150b	135c	126c	4.510	<0.001
微生物数量 Microbial populations								
乳酸菌 Lactic acid bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	7.42c	7.77a	7.66ab	7.52bc	7.69ab	7.69ab	0.033	0.002
好氧菌 Aerobic bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	5.30c	7.09a	6.71b	6.79ab	6.77ab	6.79ab	0.144	<0.001
酵母菌 Yeasts (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	5.79a	5.28b	5.31b	5.28b	5.86a	5.81a	0.065	<0.001
霉菌 Molds (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	4.75a	4.51b	4.53b	4.55b	4.77a	4.78a	0.057	<0.001

注: VFAs:挥发性脂肪酸;LA:FP:乳酸在发酵产物中的占比(发酵产物=乳酸+乙酸+丙酸+丁酸+乙醇); $\text{NH}_3\text{-N}$:氨态氮。Control:未处理的发酵全混合日粮对照组;LC:添加 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW 干酪乳杆菌处理组;LB:添加 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW 布氏乳杆菌处理组;POS:添加 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW 山梨酸钾处理组;SOD:添加 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW 双乙酸钠处理组;CAP:添加 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW 丙酸钙处理组。采用 Tukey 多重比较确定均值间的统计学差异。SEM:标准误。同行数据不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: VFAs: Volatile fatty acids; LA:FP: Percentage of lactic acid in fermentation products (FP=lactic acid+acetic acid+propionic acid+butyric acid+ethanol); $\text{NH}_3\text{-N}$: Ammonia nitrogen. Control: Untreated fermented total mixed ration; LC: *L. casei* at $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW; LB: *L. buchneri* at $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ FW; POS: Potassium sorbate at $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW; SOD: Sodium diacetate at $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW; CAP: Calcium propionate at $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW. Statistical differences among means were determined using Tukey's multiple comparison. SEM: Standard error of the mean. Values in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The same below.

组中乳酸含量最高。与对照组相比,POS、SOD和CAP组中乳酸含量显著降低。LB组中乳酸含量显著低于LC组。CAP和SOD组中丙酸及乙酸含量分别最高。各组丁酸及氨态氮含量分别低于 $2.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ 和 $93.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 总氮}$ 。与对照组相比,LC和LB组中丁酸含量较高。与其他组相比,CAP和SOD组中挥发性脂肪酸(VFAs)含量较高。LC组中LA:FP最高,各处理组中乙醇含量均显著低于对照组。

与其他组相比,LC和LB组中DM含量均较低。LB和CAP组中CP含量均高于其他组。各处理组中粗灰分含量均高于对照组。LC组中粗脂肪和ADFom含量最低,aNDFom含量最高。相较于青贮前的TMR,青贮后除LB组外各组aNDFom含量均出现升高,而处理组中ADFom含量则出现不同程度下降;青贮后,各组乳酸菌数量升高,酵母菌、霉菌和好氧菌数量则出现不同程度变化。

2.2 有氧稳定性

青贮添加剂与有氧暴露天数的交互作用对发酵TMR饲料的pH、乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、乙醇、WSC和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量及乳酸菌、好氧菌、酵母菌和霉菌数量均有显著影响($P < 0.001$)(表4和表5)。青贮添加剂对pH、乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、乙醇、WSC和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量及乳酸菌、好氧菌、酵母菌数量有显著影响($P < 0.001$)。有氧暴露14 d内,对照组、LC、LB、POS和CAP组的pH值分别增加了0.07、0.68、0.02、0.09和2.28,SOD组pH下降0.01。LC组中乳酸含量呈线性降低趋势($P < 0.001$)。有氧暴露的第9、14天时,LB和SOD组中乙酸含量较高($> 15.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$)。有氧暴露期间,对照组中乙醇含量呈降低趋势($P < 0.001$)。有氧暴露第14天时,POS组中好氧菌数量($5.50 \text{ vs. } 6.56 \sim 7.66 \log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$)和霉菌数量($4.93 \text{ vs. } 4.96 \sim 5.91 \log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$)均低于其他组。

2.3 体外消化率及产气动力学指标

青贮添加剂对体外消化率和产气动力学指标均有显著影响($P < 0.05$)(表6)。LB、POS和CAP组的IVDMD和IVNDFD均高于对照组。LC、LB和CAP组的72 h累积产气量(GP_{72})和潜在产气量均高于对照组。

3 讨论

3.1 发酵TMR原料特性

优质的青贮饲料需要具备适宜的干物质含量($250 \sim 400 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$)、较高的WSC含量、较低的缓冲能和充足的乳酸菌数量^[25]。本试验中,TMR原料中较高的干物质含量可能会抑制青贮过程中的乳酸发酵。水分是乳酸菌生长代谢所必需的,同时对青贮过程中氧气的初始水平和运输具有显著影响,因此,青贮原料中的水分含量对青贮发酵品质的优劣至关重要^[26]。Keshri等^[27]发现青贮饲料中较高的干物质含量可能会抑制青贮原料自身附着乳酸菌的繁殖能力和代谢活性。此外,青贮原料中充足的WSC含量也是获得优质青贮饲料的重要保证^[28]。本试验中,青贮前TMR饲料的WSC含量高于 $60 \sim 70 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ (此含量被认为是制作优质青贮饲料的理论最低值),这有助于青贮中乳酸菌的生长繁殖,促进乳酸发酵,可确保青贮发酵过程成功进行^[29]。

本试验中,TMR原料上发现附着有较高数量的酵母菌和霉菌。青贮过程中,酵母菌大量繁殖会导致青贮饲料中干物质和能量损失较大^[30]。有氧暴露后,酵母菌通过消耗发酵底物和乳酸引起青贮饲料中pH值和内部温度升高,造成有氧腐败^[31]。最终,霉菌也会介入促使青贮饲料发霉变质^[32]。研究表明,对于保存良好的青贮饲料,霉菌和酵母菌数量不应超过 $3 \sim 4 \log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ^[33],青贮饲料中酵母菌和霉菌的数量越多,有氧暴露后其有氧腐败的风险就越大。此外,青贮前TMR原料中较高的粗脂肪含量也会促使青贮饲料中不良微生物的生长繁殖,最终影响青贮发酵品质^[34]。因此,使用一些抗真菌添加剂来改善发酵TMR饲料的卫生品质是很有必要的。本试验中,提出可以利用生物和化学添加剂将含湿啤酒糟的TMR原料发酵制成优质TMR青贮饲料。

3.2 添加剂对TMR青贮饲料发酵品质的影响

青贮100 d后,各组发酵TMR饲料均保存良好,但其pH值均大于4.2,这可能是由于各组中干物质含量较高导致的。研究表明,干物质含量较高的青贮饲料在较高的pH条件下依然能得到良好贮存^[35]。此外,各组发酵TMR饲料中乳酸含量均在 $80 \sim 120 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ 的理想范围内^[36]。LC组中乳酸含量最高,这可能是由于干酪乳杆菌属于兼性异型发酵乳酸菌,通常将己糖同型发酵为乳酸,但在特殊条件下会进行异型发酵,产生乳酸、 CO_2 和乙醇(或乙酸)^[37]。LB组中乳酸含量低于LC组,可能与乳酸菌(LAB)接种剂中乳酸菌菌株的代谢途径不同有关。布氏乳杆菌属于专性异型发酵乳酸菌,可将己糖发酵为乳酸、二氧化碳和乙醇(或乙酸),其产乳酸效率低于干酪

表4 发酵全混合日粮饲料有氧暴露期间pH及发酵产物的变化

Table 4 Changes in pH and fermentation products of fermented total mixed ration after exposure to air

项目 Items	处理 Treatments (T)	有氧暴露天数 Days of air exposure				标准误 SEM	P值 P value			
		0 d	6 d	9 d	14 d		T	L	Q	T×D
pH	Control	4.47Ba	4.47Bb	4.51ABa	4.54Ac	0.006	<0.001	0.002	0.164	<0.001
	LC	4.32Bd	4.33Bc	4.37Bc	5.00Ab			<0.001	<0.001	
	LB	4.34Bcd	4.36Bc	4.44Ab	4.36Bc			0.010	<0.001	
	POS	4.37Cc	4.42Bb	4.50Aab	4.46ABc			<0.001	0.005	
	SOD	4.45Aa	4.46Ab	4.46Aab	4.44Ac			0.688	0.334	
	CAP	4.41Bb	4.55Ba	4.46Bab	6.69Aa			<0.001	<0.001	
乳酸 Lactic acid (g·kg ⁻¹ DM)	Control	99.2Ab	93.4Bc	86.9Cbc	84.1Cc	0.208	<0.001	<0.001	0.444	<0.001
	LC	112.4Aa	103.0Bb	84.8Cc	74.9Dd			<0.001	0.209	
	LB	86.4Ce	108.3Aa	102.7Ba	103.7Ba			<0.001	<0.001	
	POS	90.4Bd	92.6ABc	89.7Bbc	95.6Ab			0.004	0.047	
	SOD	86.9Dde	101.3Ab	90.9Cb	95.2Bb			0.001	<0.001	
	CAP	95.2Ac	95.9Ac	74.1Bd	52.7Ce			<0.001	<0.001	
乙酸 Acetic acid (g·kg ⁻¹ DM)	Control	13.8Ab	13.7Ab	13.2Aab	5.3Bc	0.112	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	LC	13.6Ab	12.4Ab	12.0Ab	3.2Bcd			<0.001	<0.001	
	LB	12.9Bb	14.2ABb	15.8Aa	15.5ABa			0.008	0.263	
	POS	12.5Ab	12.1Ab	10.7Ab	8.3Bb			<0.001	0.041	
	SOD	19.2Aa	17.7ABa	15.8Ba	16.4Ba			0.003	0.129	
	CAP	9.5Ac	6.3Bc	5.5Bc	2.8Cd			<0.001	0.977	
丙酸 Propionic acid (g·kg ⁻¹ DM)	Control	2.95Ccd	3.35BCb	3.66ABc	4.11Ab	0.034	<0.001	<0.001	0.576	<0.001
	LC	3.30Bbc	3.56Bb	3.38Bcd	4.14Ab			0.001	0.035	
	LB	3.44Bb	3.64Bb	4.59Ab	4.05ABb			0.007	0.086	
	POS	2.46Ce	2.53BCb	2.85Bd	3.33Ac			<0.001	0.016	
	SOD	2.51Bde	3.50Ab	3.24Acd	3.61Abc			0.001	0.086	
	CAP	8.32Aa	8.47Aa	7.78Aa	5.52Ba			<0.001	0.002	
丁酸 Butyric acid (g·kg ⁻¹ DM)	Control	0.84Bc	1.45Aa	0.92Ba	0.89Bb	0.012	<0.001	0.739	0.001	<0.001
	LC	1.72Aa	1.39Ba	0.61Db	0.96Cab			<0.001	0.001	
	LB	1.75Aa	1.63Aa	0.97Ba	1.06Bab			<0.001	0.465	
	POS	1.61Aab	1.56Aa	0.69Cb	1.14Bab			<0.001	0.001	
	SOD	1.47Ab	1.44Aa	0.49Cb	1.05Bab			<0.001	0.002	
	CAP	1.51Aab	1.33ABa	0.69Cb	1.18Ba			<0.001	0.001	
乙醇 Ethanol (g·kg ⁻¹ DM)	Control	11.14Aa	1.19Cc	2.35Bcd	2.53Bc	0.032	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	LC	1.24Dc	2.56Cb	4.64Aa	3.77Bb			<0.001	0.001	
	LB	2.06Ac	1.65Ac	2.21Ad	1.52Ad			0.127	0.443	
	POS	3.48Cb	3.80BCa	4.06Bb	4.73Aa			<0.001	0.085	
	SOD	3.32Bb	2.67Cb	2.80Cc	4.50Aa			<0.001	<0.001	
	CAP	3.14Bb	3.83Aa	3.72ABb	4.33Aab			<0.001	0.945	

注：同列数据不同小写字母表示同一天数不同处理间差异显著($P<0.05$)；同行数据不同大写字母表示同一指标不同天数间差异显著($P<0.05$)。T：青贮添加剂处理；L和Q，分别代表有氧暴露天数的线性和二次效应；T×D：青贮添加剂和有氧暴露天数(D)的交互作用。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among different treatments at the same day ($P<0.05$); Different capital letters in the same row indicate significant differences among different days at the same treatment ($P<0.05$). T: Effect of silage additives; L and Q represent linear and quadratic effects of exposure days respectively; T×D: Effect of interaction between silage additives and exposure days (D). The same below.

表 5 发酵全混合日粮饲料有氧暴露期间化学成分和微生物数量的变化

Table 5 Changes in chemical compositions and microbial populations of fermented total mixed ration after exposure to air

项目 Items	处理 Treatments (T)	有氧暴露天数 Days of air exposure				标准误 SEM	P 值 P value			
		0 d	6 d	9 d	14 d		T	L	Q	T×D
水溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates (g·kg ⁻¹ DM)	Control	35.8Ade	18.4Cc	18.4Ca	21.8Ba	0.178	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	LC	34.4Ae	21.5Bbc	14.4Cb	16.8Cbc			<0.001	<0.001	
	LB	41.8Ac	30.3Ba	13.9Cb	15.3Cbc			<0.001	<0.001	
	POS	45.9Ab	18.2BCc	21.4Ba	17.1Cbc			<0.001	<0.001	
	SOD	38.6Acd	23.4Bb	13.6Cb	13.6Cc			<0.001	<0.001	
	CAP	52.5Aa	23.8Bb	14.1Cb	17.6Cb			<0.001	<0.001	
氨态氮 Ammonia nitrogen (g·kg ⁻¹ total nitrogen)	Control	86.3ABab	82.3Bc	80.6Bc	88.9Ab	0.248	<0.001	0.399	0.002	<0.001
	LC	91.8Aa	91.6Aab	85.7Bb	78.7Ccd			<0.001	0.001	
	LB	90.9Ba	92.7Ba	105.0Aa	108.0Aa			<0.001	0.192	
	POS	88.6Aab	84.5ABbc	80.0Bc	82.5Bc			0.002	0.028	
	SOD	76.7Bc	87.0Aabc	82.9Abc	76.3Bd			0.726	<0.001	
	CAP	83.5ABb	84.7Abc	65.7Cd	76.6Bd			0.002	0.047	
乳酸菌 Lactic acid bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	Control	7.42BCc	6.99Ccd	8.59Aa	8.00ABbc	0.021	<0.001	0.004	0.987	<0.001
	LC	7.77Ba	7.55Bab	8.73Aa	8.58Aab			<0.001	0.108	
	LB	7.66Bab	6.90Ccd	8.29Aa	7.71Bcd			0.051	0.202	
	POS	7.52Bbc	7.22Bbc	8.47Aa	7.23Bd			0.935	0.002	
	SOD	7.69Bab	6.71Cd	8.57Aa	8.62Aab			<0.001	<0.001	
	CAP	7.69Bab	7.73Ba	8.56Aa	8.81Aa			<0.001	0.087	
好氧菌 Aerobic bacteria (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	Control	5.30Cc	8.33Aa	6.82Ba	6.56Bb	0.023	<0.001	0.002	<0.001	<0.001
	LC	7.09ABa	7.29Ab	6.79Ba	7.38Aa			0.173	0.047	
	LB	6.71Bb	6.49Bc	6.66Bab	7.34Aa			<0.001	<0.001	
	POS	6.79Aab	6.36Bc	5.49Cc	5.50Cc			<0.001	0.132	
	SOD	6.77ABab	6.23Bc	6.46Bab	7.40Aa			0.019	0.001	
	CAP	6.79Bab	7.56Ab	6.13Cb	7.66Aa			0.007	0.010	
酵母菌 Yeasts (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	Control	5.79Ca	6.96Aa	6.31Ba	5.70Cb	0.028	<0.001	0.100	<0.001	<0.001
	LC	5.28Cb	6.81Aa	6.39Ba	6.82Aa			<0.001	<0.001	
	LB	5.31Ab	5.70Ab	6.07Aa	5.91Aab			0.094	0.361	
	POS	5.28Bb	5.61ABb	5.38ABb	5.90Aab			0.010	0.382	
	SOD	5.86Ba	5.86Bb	6.21Ba	6.70Aa			<0.001	0.022	
	CAP	5.81Ba	6.55Aa	6.46Aa	6.62Aab			0.001	0.044	
霉菌 Molds (Log ₁₀ cfu·g ⁻¹ FW)	Control	4.75Ca	5.89Aa	5.27Ba	5.61Ab	0.026	<0.001	0.090	<0.001	<0.001
	LC	4.51Cb	5.75Aa	5.23Ba	5.91Aa			<0.001	<0.001	
	LB	4.53Bb	4.81Ac	5.02Ab	4.96Ac			0.083	0.342	
	POS	4.55Bb	4.52Bd	4.16Cc	4.93Ac			0.012	0.405	
	SOD	4.77Ba	4.89Bc	5.39Aa	5.68Ab			<0.001	0.010	
	CAP	4.78Ba	5.48Ab	5.39Aa	5.58Ab			<0.001	0.032	

乳杆菌^[37]。因此,作为发酵 TMR 饲料的乳酸菌接种剂,干酪乳杆菌在青贮发酵过程中的产乳酸能力要强于布氏乳杆菌。LC 组中较高的 LA:FP 也证实了 LC 组中较强的同型发酵。

与对照组相比,POS、SOD 和 CAP 组中乳酸含量较低,可能是由于这些化学添加剂的抗菌特性抑制了青贮饲料中微生物(包括乳酸菌)的生长和活性^[2]。山梨酸钾、双乙酸钠和丙酸钙添加剂可以电离产生相应的有机酸

表 6 发酵 100d 后全混合日粮饲料的体外产气动力学指标及体外消化率

Table 6 *In vitro* gas production kinetics and digestibility of fermented total mixed ration after 100 days of fermentation

项目 Items	处理 Treatments						标准误 SEM	P 值 P value
	Control	LC	LB	POS	SOD	CAP		
体外消化率 <i>In vitro</i> digestibility								
体外干物质消化率 IVDMD (%)	55. 3c	57. 9bc	59. 2bc	62. 5ab	56. 2c	65. 4a	0. 9182	<0. 001
体外中性洗涤纤维消化率 IVNDFD (%)	48. 2d	51. 7bcd	53. 2bc	56. 3ab	50. 3cd	59. 1a	0. 9652	<0. 001
体外产气动力学指标 Gas production kinetics								
体外培养 72 h 累积产气量 GP ₇₂ (mL)	164c	195ab	186b	167c	167c	203a	3. 8216	<0. 001
潜在产气量 Potential gas production (mL)	170c	195b	192b	173c	172c	209a	1. 3100	0. 006
产气速率 Gas production rate constant (mL·h ⁻¹)	0. 042c	0. 053a	0. 041c	0. 042c	0. 045b	0. 046b	0. 0012	0. 036

注: IVDMD: 体外干物质消化率; IVNDFD: 体外中性洗涤纤维消化率; GP₇₂: 体外培养 72 h 累积产气量。

Note: IVDMD: *In vitro* dry matter digestibility; IVNDFD: *In vitro* neutral detergent fiber degradability; GP₇₂: Cumulative gas production at incubation time 72 hours.

(主要有山梨酸、乙酸、丙酸)和盐离子,它们具有酸性特性和抗菌性能^[38]。这些有机酸的未解离分子可以穿过质膜,释放质子使细胞质酸化,从而阻止微生物的生长和活动^[39]。Han等^[40]发现施用苯甲酸钠(1 g·kg⁻¹ FW)添加剂不仅可以抑制发酵 TMR 饲料中不良微生物的生长,还会抑制乳酸菌的活性。因此,有机酸盐的适宜添加量还需在今后研究中进一步评估。此外,CAP 和 SOD 组的丙酸和乙酸含量分别在各处理组中均最高,这可能是由于丙酸钙和双乙酸钠添加剂电离产生了一定的丙酸和乙酸,这也侧面解释了 CAP 和 SOD 组中 VFAs 含量高于其他组的现象。

优质的青贮饲料中丁酸含量应低于 5 g·kg⁻¹ DM^[41]。各组发酵 TMR 饲料中丁酸含量均小于 5 g·kg⁻¹ DM,表明发酵良好。青贮饲料中的氨态氮含量是反映蛋白质降解程度的指标,它直接影响着青贮饲料的营养价值。在发酵良好的青贮饲料中,氨态氮含量不应超过 100 g·kg⁻¹ 总氮(total nitrogen, TN)^[42]。本试验中,各组的氨态氮含量均小于 92 g·kg⁻¹ TN,证明各组 TMR 青贮饲料发酵品质良好。较高的干物质含量可有效抑制梭菌和肠杆菌的生长^[40],这可能是各组丁酸及氨态氮含量均较低的原因。此外,LC 和 LB 组中丁酸含量高于对照组,这可能是由于发酵 TMR 饲料中较高的干物质含量抑制青贮早期干酪乳杆菌和布氏乳杆菌的代谢活性。LB 和 LC 组中干物质含量远低于其他组,这可能与 LB 和 LC 组中的 LAB 代谢活性增强有关。青贮过程中的酸性环境导致各处理组中 ADFom 含量降低,这可能与青贮饲料中结构性碳水化合物发生酸解有关^[4]。此外,相比于青贮前的 TMR,发酵后除 LB 组外各组 aNDFom 含量升高,这可能是由于青贮过程中存在干物质损失,造成一定干物质含量范围内的 aNDFom 浓度增加。青贮后,各组乳酸菌数量出现升高,而酵母菌、霉菌和好氧菌数量均出现不同程度变化,其中乳酸菌接种剂和山梨酸钾添加剂对酵母菌和霉菌的抑制效果较为明显,这可能是由于青贮过程中的厌氧和酸性环境促进了乳酸菌的生长,同时乳酸菌的代谢产物和山梨酸钾解离生成的山梨酸均能有效抑制不良微生物的增殖。

青贮过程中,酵母菌可以代谢 WSC 产生二氧化碳和乙醇^[43]。本试验中,各处理组的乙醇含量均低于对照组,表明生物与化学添加剂均可抑制酵母菌活性,这可能是由于酸性环境及电离产生的有机酸抑制了酵母菌^[44-45]。与其他组相比,LC 和 LB 组中干物质含量较低,且干物质损失较高,这可能与干酪乳杆菌和布氏乳杆菌具有不同的代谢途径有关。Holzer等^[37]研究发现,在异型发酵过程中,由于二氧化碳的产生,基于消耗 WSC 的干物质损失为 5%~24%。

3.3 添加剂对 TMR 青贮饲料有氧稳定性的影响

引起有氧腐败的微生物往往会造成青贮饲料 pH 值升高和营养物质大量损失^[46]。有氧暴露期间,LC 和 CAP 组中 pH 值升高,表明 LC 和 CAP 组在有氧暴露 14 d 后发生了有氧腐败,这可能与 LC 和 CAP 组中较高的乳酸和

WSC 含量有关。有氧腐败主要是由于耐酸的酵母大量消耗乳酸引起的^[47]。青贮窖开启后,较高的剩余 WSC 含量极易被酵母利用引起有氧腐败^[48]。因此,发酵 TMR 饲料中乳酸和 WSC 含量越高,越易发生有氧腐败。Holzer 等^[37]也发现较高含量的乳酸和 WSC 以及 VFAs 的缺乏容易导致青贮饲料有氧腐败。

本试验中,LC 和 CAP 组中乳酸含量的急剧下降进一步证明了在有氧暴露期间大量乳酸被酵母菌消耗利用。此外,LB 和 SOD 组有氧暴露 14 d 后 pH 升高幅度较小,表明其有氧稳定性良好,这可能与它们含有较高的乙酸含量有关。研究表明,乙酸可有效抑制不良微生物的生长和活性,从而提高青贮饲料的有氧稳定性^[44]。酵母菌可通过消耗 WSC 产生乙醇,青贮饲料中较高的乙醇含量常伴随着较高的酵母菌数量和活性^[49]。因此,有氧暴露期间对照组中降低的乙醇含量表明了对照组中酵母菌的代谢活性也在不断下降。

有氧暴露 14 d 后,POS 组中好氧菌和霉菌数量均低于其他各组,表明在有氧暴露期间山梨酸钾对好氧菌和霉菌的抑制效果要优于其他添加剂,这可能是由于山梨酸钾可以电离形成具有抗菌特性的山梨酸,而未解离的山梨酸可以穿过微生物的细胞膜,破坏微生物的代谢活性^[4]。此外,有机酸添加剂的抗菌效果取决于其解离常数(pKa)和环境 pH,当环境 pH 低于其 pKa 时,有机酸添加剂会表现出更高的抗菌活性^[44]。POS、SOD 和 CAP 的 pKa 值相近,青贮发酵 100 d 后,POS 组比 SOD 和 CAP 组的抑菌效果更显著,这可能与 POS 组中 pH 值较低有关。

3.4 添加剂对 TMR 青贮饲料体外产气及消化率的影响

体外瘤胃产气量受可利用的氮含量和可发酵的碳水化合物含量影响^[50-51]。Menke 等^[52]研究发现,体外产气量与饲料的有机物消化率之间具有很强的相关性。大量研究人员已成功应用这项技术来评估饲料的消化率^[53-54],因为产气速率可以反映瘤胃的消化速率,从而影响干物质采食量。本试验中,与对照组相比,各处理组中发酵 TMR 饲料的潜在产气量和 GP₇₂ 均有所增加,这可能是由于不同的添加剂处理减少了营养物质损失,从而提高了体外产气量,这与 Kozelov 等^[55]和 Li 等^[56]的研究结果相一致。体外干物质消化率是反映瘤胃饲料利用率的一个重要参数,对干物质的消化主要包括 WSC、蛋白质、纤维等物质^[57]。LB、POS 和 CAP 组中的 IVDMD 和 IVNDFD 均高于对照组,这可能是由于 LB、POS 和 CAP 组中的 WSC 含量高于对照组。与对照组相比,LC、LB 和 CAP 组的 GP₇₂ 和潜在产气量更高,这可能是由于这 3 种添加剂对酵母菌和霉菌的生长及活性具有抑制作用,从而减少了营养损失,为微生物的代谢活动提供了充足的底物和能量^[2]。

4 结论

青贮 100 d 后,各组发酵 TMR 饲料均保存良好。对照组、LB、POS 和 SOD 组在有氧暴露的 14 d 内均呈稳定状态,而 POS 组在有氧暴露第 14 天时凭借好氧菌和霉菌数量较低而更加稳定。POS 和 CAP 组提高了发酵 TMR 饲料的 IVDMD 和 IVNDFD。综合考虑,在生产含 100 g·kg⁻¹ FW 湿啤酒糟发酵 TMR 饲料时可添加 1 g·kg⁻¹ FW 的山梨酸钾,既能改善有氧稳定性,还可提高体外消化率。本研究结果可为养殖户开发当地非常规饲料资源提供新思路,有效实现降本增效,具有一定推广价值,最终促进当地养殖业的蓬勃发展。

参考文献 References:

- [1] Kondo M, Shimizu K, Jayanegara A, *et al.* Changes in nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of total mixed ration silage stored at different temperatures and periods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 96(4): 1175—1180.
- [2] Dai T, Dong D, Wang S, *et al.* The effectiveness of chemical additives on fermentation profiles, aerobic stability and *in vitro* ruminal digestibility of total mixed ration ensiled with Napier grass and wet distillers' grains in southeast China. *Italian Journal of Animal Science*, 2022, 21(1): 979—989.
- [3] Bueno A, Lazzari G, Jobim C C, *et al.* Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy*, 2020, 10(6): 879.
- [4] Dai T, Dong D, Wang S, *et al.* Assessment of organic acid salts on fermentation quality, aerobic stability, and *in vitro* rumen digestibility of total mixed ration silage. *Tropical Animal Health and Production*, 2022, 54(5): 1—12.
- [5] Wang S, Zhao J, Yu C, *et al.* Nutritional evaluation of wet brewers' grains as substitute for common vetch in ensiled total mixed ration. *Italian Journal of Animal Science*, 2020, 19(1): 1015—1025.

- [6] Queiroz O C M, Arriola K G, Daniel J L P, *et al.* Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5836—5843.
- [7] Nishino N, Hattori H, Wada H, *et al.* Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(2): 325—332.
- [8] Kleinschmit D H, Kung J R L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(10): 4005—4013.
- [9] Muck R E. Recent advances in silage microbiology. *Agriculture and Food Science*, 2013, 22(1): 3—15.
- [10] Kung L J R, Stokes M R, Linc J. Silage additives. II Buxton D R, Muck R E, Harrison J H. *Silage science and technology*. Madison, WI, USA; American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003.
- [11] Kung L J R, Smith M L, da Silva E B, *et al.* An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(7): 5949—5960.
- [12] Knický M, Spörndly R. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(15): 2659—2667.
- [13] Li Y F, Wang L L, Jeong E C, *et al.* Effects of sodium diacetate or microbial inoculants on aerobic stability of wilted rye silage. *Animal Bioscience*, 2022, 35(12): 1871—1880.
- [14] Okur A A, Gozluklu K, Okur E, *et al.* Effects of apple vinegar addition on aerobic deterioration of fermented high moisture maize using infrared thermography as an indicator. *Sensors*, 2022, 22(3): 771.
- [15] Mills J A, Kung J R L. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(8): 1969—1975.
- [16] Wilkinson J M, Davies D R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*, 2013, 68(1): 1—19.
- [17] Jasaitis D K, Wohlt J E, Evans J L. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70(7): 1391—1403.
- [18] Broderick G A, Kang J H. 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.
- [19] Conaghan P, O'kiely P, O'mara F P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(2): 628—643.
- [20] Owens V, Albrecht K, Muck R, *et al.* Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Science*, 1999, 39(6): 1873—1880.
- [21] Association of Official and Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of analysis* (18th edition). Washington: 2000.
- [22] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583—3597.
- [23] National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of beef cattle: Update 2000*. Washington: National Academy Press, 2000.
- [24] Menke K H, Raab L, Salewski A, *et al.* The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science*, 1979, 93(1): 217—222.
- [25] Chen L, Yuan X J, Li J F, *et al.* Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and *in vitro* gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(7): 1592—1600.
- [26] Ni K, Wang Y, Pang H, *et al.* Effect of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and chemical composition of wheat straw silage. *American Journal of Plant Science*, 2014, 5(13): 1877—1884.
- [27] Keshri J, Chen Y, Pinto R, *et al.* Bacterial dynamics of wheat silage. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1532.
- [28] Li P, Zhang Y, Gou W, *et al.* Silage fermentation and bacterial community of bur clover, annual ryegrass and their mixtures prepared with microbial inoculant and chemical additive. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 247: 285—293.

- [29] Wang S, Yuan X, Dong Z, *et al.* Effect of ensiling corn stover with legume herbages in different proportions on fermentation characteristics, nutritive quality and *in vitro* digestibility on the Tibetan Plateau. *Grassland Science*, 2017, 63(4): 236—244.
- [30] Carvalho B F, Avila C L S, Pinto J C, *et al.* Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 195: 1—13.
- [31] Pahlow G, Muck R E, Driehuis F, *et al.* Microbiology of ensiling. II Buxton D R, Muck R E, Harrison J H. *Silage science and technology*. Madison, WI: American Society of Agronomy, 2003: 31—93.
- [32] Dolci P, Tabacco E, Coccolin L, *et al.* Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(21): 7499—7507.
- [33] Mceniry J, O'kiely P, Clipson N J W, *et al.* The microbiological and chemical composition of baled and precision-chop silages on a sample of farms in County Meath. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 2006, 45(1): 73—83.
- [34] Du Z, Sun L, Lin Y, *et al.* The use of PacBio SMRT technology to explore the microbial network and fermentation characteristics of woody silage prepared with exogenous carbohydrate additives. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(5): 2193—2211.
- [35] Leibensperger R Y, Pitt R E. Modelling the effects of formic acid and molasses on ensilage. *Journal of Dairy Science*, 1988, 71(5): 1220—1231.
- [36] Chamberlain A T, Wilkinson J M. *Feeding the dairy cow*. Lincoln, UK: Chalcombe Publications, 1996.
- [37] Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, *et al.* The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 282—287.
- [38] Wen A Y, Yuan X J, Wang J, *et al.* Effects of four short-chain fatty acids or salts on dynamics of fermentation and microbial characteristics of alfalfa silage. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 223: 141—148.
- [39] Kleinschmit D H, Schmidt R J, Kung L J R. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(6): 2130—2139.
- [40] Han Z, Xu G, Wang S, *et al.* Antimicrobial effects of four chemical additives on fermentation quality, aerobic stability, and *in vitro* ruminal digestibility of total mixed ration silage prepared with local food by-products. *Animal Science Journal*, 2022, 93(1): e13755.
- [41] Kung J R L, Shaver R D, Grant R J, *et al.* Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4020—4033.
- [42] McDonald P, Edwards R A, Greenhalgh J F D, *et al.* *Animal nutrition* (6th edition). Longman Scientific and Technical. 2002: 515—535.
- [43] Weinberg Z G. *Preservation of forage crops by solid-state lactic acid fermentation-ensiling*. Springer, 2008: 443—467.
- [44] Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, *et al.* Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 562—567.
- [45] Sun L, Bai C, Xu H, *et al.* Succession of bacterial community during the initial aerobic, intense fermentation, and stable phases of whole-plant corn silages treated with lactic acid bacteria suspensions prepared from other silages. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 655095.
- [46] McDonald P, Henderson A, Heron S J E. *The biochemistry of silage*. Marlow, Bucks, UK: Chalcombe Publications, 1991.
- [47] Basso F C, Bernardes T F, Roth A P D T P, *et al.* Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2012, 41: 1789—1794.
- [48] Wang S R, Li J F, Zhao J, *et al.* Effect of epiphytic microbiota from napiergrass and Sudan grass on fermentation characteristics and bacterial community in oat silage. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(2): 919—932.
- [49] da Silva E B, Savage R M, Biddle A S, *et al.* Effects of a chemical additive on the fermentation, microbial communities, and aerobic stability of corn silage with or without air stress during storage. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(8): 1—11.
- [50] Kondo M, Kita K, Yokota H O. Effects of tea leaf waste of green tea, oolong tea, and black tea addition on sudangrass silage quality and *in vitro* gas production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(7): 721—727.
- [51] Nagadi S M, Herrero M, Jessop N S. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 2000, 87(3/4): 231—239.
- [52] Menke K H, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production

using rumen fluid. *Animal Research Development*, 1988, 28: 7—55.

- [53] Muck R E, Filya I, Contreras-govea F E. Inoculant effects on alfalfa silage: *In vitro* gas and volatile fatty acid production. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(11): 5115—5125.
- [54] Negesse T, Makkar H P S, Becker K. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an *in vitro* gas method. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 154(3/4): 204—217.
- [55] Kozelov L K, Iliev F, Hristov A N, *et al.* Effect of fibrolytic enzymes and an inoculant on *in vitro* degradability and gas production of low-dry matter alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(14): 2568—2575.
- [56] Li M, Zi X, Zhou H, *et al.* Effects of sucrose, glucose, molasses and cellulase on fermentation quality and *in vitro* gas production of king grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 197: 206—212.
- [57] Chen L, Yuan X J, Li J F, *et al.* Effects of applying lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* gas production of forage-based total mixed ration silage in Tibet. *Animal Production Science*, 2019, 59(2): 376—383.