

刘蓓一,丁成龙,乔伟艳,等. 利用 PCR-DGGE 技术研究稻草与黑麦草混合青贮过程中菌群的动态变化[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):123-126.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.034

利用 PCR-DGGE 技术研究稻草与黑麦草混合青贮过程中菌群的动态变化

刘蓓一,丁成龙,乔伟艳,李健,许能祥,潘孝青,秦枫,张霞,顾洪如

(江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014)

摘要:为了探讨稻草与黑麦草混合青贮发酵过程中微生物的动态变化规律,以稻草、黑麦草为青贮原料,从青贮后 1、5、12、21、31、61、99、154 d 的稻草、黑麦草混合青贮样中取样,分别测定 pH 值,采用培养方法计数乳酸菌、酵母菌、霉菌数量的变化,使用 PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术分析青贮过程中菌群组成多样性。结果表明:黑麦草与稻草混合青贮 pH 值在青贮初期下降迅速,乳酸菌数量在 5d 达到最高峰,然后逐渐下降,酵母菌数量呈先降后升再降等波动变化,稻草与黑麦草混合青贮过程中优势菌主要有植物乳杆菌(*Lactococcus plantarum*)、类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*)、食蜜魏斯氏菌(*W. cibaria*)、短乳杆菌(*L. brevis*),且随着青贮时间延长,优势菌数量下降。由结果可知,将 DGGE 和 16S rRNA 序列分析技术结合,能有效地研究青贮细菌的遗传多样性和组成的变化。

关键词:青贮;微生物培养;动态变化;PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0123-04

秸秆的饲料化利用,是其资源化利用的有效途径之一,也是促进农区草食动物发展的重要措施。我国农作物秸秆总量达 52 056 万 t 以上,其中稻草 21 129 万 t^[1]。稻草与其他禾本科牧草青贮原料相比,干物质含量高,但茎叶上自然附着的乳酸菌数量少,可溶性碳水化合物含量低^[2],所以常规青贮很难调制出高品质的青贮料。多花黑麦草具有可溶性碳水化合物含量高、纤维素和木质素含量低的优点,但其含水量高,直接青贮容易产生大量的渗液,导致青贮饲料酸度大,从而降低青贮饲料的营养成分^[3]。水稻秸秆和黑麦草混合青贮,不仅能解决稻草可溶性碳水化合物含量低、青贮不易成功的问题,还能解决黑麦草水分含量高、不易青贮的问题。李君临等指出,黑麦草单独青贮不易成功,与水稻秸秆按 7:3 混合青贮时发酵品质最佳,显著降低了氨态氮占总氮的比例以及乙酸、丙酸和丁酸的含量^[4]。青贮饲料是个复杂的微生物共生体系,主要包括乳酸菌、酵母菌、霉菌及其他腐败细菌^[5],而青贮饲料品质的优劣直接取决于乳酸菌的增殖与变化。在发酵初期,乳酸菌开始增殖,随着 pH 值的逐渐下降和厌氧程度的加强,乳酸菌在数量上逐渐形成绝对优势,其他微生物的生长受到抑制,乳酸菌产生大量乳酸,使 pH 值进一步下降,其他微生物的活性进一步减弱,当 pH 值下降到一定程度以后,乳杆菌的活性也受到了抑制^[6]。可见,青贮过程中微生物数量及种群的动态变化研究十分重要。包慧芳等指出,玉

米秸秆青贮饲料发酵过程中优势菌主要有植物乳杆菌(*Lactococcus plantarum*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*),且采用菌剂处理后青贮玉米 pH 值下降更快,其优势细菌种类更丰富^[7]。詹发强等研究发现,乳杆菌属、片球菌属是青贮玉米发酵的启动菌之一,在发酵前期一直存在,但在发酵后期,乳杆菌属是玉米青贮过程中乳酸菌的主要菌群^[8]。杨云贵等指出,在玉米青贮过程中,主要微生物随着青贮时间的延长呈现逐步减少的趋势,而乳酸菌在青贮第 6、7 天数量最高,之后呈现缓慢下降的趋势^[9]。目前,有关黑麦草与稻草混合青贮发酵过程中微生物动态变化规律没有相关报道。

本研究通过跟踪微生物数量在稻草与黑麦草混合青贮过程中的变化情况,以及利用 PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)方法对稻草与黑麦草混合青贮中细菌多样性进行研究,从而了解青贮发酵过程中微生物动态变化规律,以期对青贮微生物研究及复合型添加剂的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 青贮的制作与采样

将新鲜的多花黑麦草、水稻秸秆切短至 2~3 cm,按多花黑麦草:水稻秸秆质量比=7:3 进行混贮,用聚酯乙烯(52 cm×38 cm)青贮,每袋装至半袋(约 500 g),没有加入添加剂,用真空封口机封口。分别于青贮后 1、5、12、21、31、61、99、154 d 开袋取样。

1.2 青贮 pH 值测定

称取 25 g 样品,加入 200 mL 三角瓶中,加入 700 mL 蒸馏水后置于 4℃ 冰箱内浸提 24 h。然后通过 2 层纱布和滤纸过滤,测定滤液 pH 值。

1.3 菌株分离培养方法

称取样品 10 g 放入已灭菌的小三角瓶中,加入 90 mL 无

收稿日期:2016-03-22

基金项目:公益性行业科研专项(编号:201303061);国家农业产业技术体系项目(编号:CARS-35-31)。

作者简介:刘蓓一(1984—),女,江苏常州人,博士,助理研究员,主要从事饲草调制与草食动物营养研究。Tel:(025)84390671;E-mail:byliu@jaas.ac.cn。

通信作者:顾洪如,研究员,研究方向为草业科学与畜牧规模养殖。

E-mail:guhongrujs@163.com。

菌生理盐水,密封,在摇床上以 120 r/min 摇 2 h。用 1 层无菌纱布过滤青贮草渣,然后逐级稀释,接种 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释梯度的悬浮液于 MRS 培养基 (CM036, Oxoid) 上,37 ℃ 厌氧培养 48 h,计算乳酸菌数量。将梯度稀释的悬浮液接种于葡萄糖麦芽浸膏培养基上,30 ℃ 培养 24 h,计算酵母菌数量。将梯度稀释的悬浮液接种于马铃薯培养基 (CM0139, Oxoid) 上,30 ℃ 培养 24 h,计算霉菌数量。

选取 MRS 培养基上光滑、圆形、灰白色菌落进行乳酸菌计数;选取葡萄糖麦芽浸膏培养基上大而厚、湿润、表面光滑、多数不透明、黏稠、菌落颜色单调的菌落进行酵母菌计数;选取马铃薯培养基上菌丝细长,菌落疏松,呈绒毛状、蛛网状、棉絮状菌落进行霉菌计数。对菌落数在 10~100 个的培养皿进行有效性计数:

样品中活菌数 $A = N \times D / m$ 。

式中: N 为菌落数,个; D 为稀释倍数; m 为取样量,g。

1.4 青贮饲料菌群总 DNA 提取

取青贮饲料样 10 g,加入 90 mL 无菌生理盐水,密封,在摇床上以 120 r/min 摇 2 h。用 1 层无菌纱布过滤青贮草渣,8 000 g 离心 15 min 收集细菌菌体,然后按照 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, USA) 说明书提取青贮饲料菌群的总 DNA。

1.5 16S rDNA V3 区域的 PCR 扩增

以纯化后的基因组 DNA 为 PCR 反应的模版,扩增 16S rDNA V3 区的基因,引物参照 Muyzer,引物序列: F338, 5′-CGCCGCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3′; R518, 5′-ATTACGCGGC TGCTGG-3′。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增片段为 200 bp。

PCR 反应体系 (25 μL): 2.5 μL 10 × PCR buffer, 2 μL 2.5 mmol/L dNTP, 2.5 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL 10 μmol/L 引物, 0.2 μL 5 U/μL Taq DNA 酶,加 ddH₂O 至 25 μL。

PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。用 1.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.6 DGGE 分析

参照 Muyzer 等的方法^[10],将 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物于 8% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离。变性剂浓度范围为 45%~60%,变性梯度方向与电泳方向一致。电泳采用 D-code DGGE 系统 (Bio-Rad),电泳缓冲液为 1 × TAE, 240 V 电压预电泳 30 min,在恒温 60 ℃ 下的 1 × TAE 缓冲液中进行,80 V 电泳 15 h,电泳结束后用 AgNO₃ 染色,显色定影后用 Vilber 凝胶成像扫描系统照像。凝胶拍照成像后,用灭菌刀片切下含目的条带的凝胶块,将凝胶块转移至微量离心管中,用枪头将胶块捣碎,加入 50 μL ddH₂O, 98 ℃ 煮沸 10 min 后于 4 ℃ 过夜。在进行第 2 次 PCR 前,于 12 000 r/min 离心 5 min 以上,吸取上清作为模板。

采用 16S rRNA 片段 V3 区引物 (不带“GC”夹板) 的 F338, R518 对 DGGE 胶上切下的目的条带进行第 2 次 PCR 扩增,反应体系、反应条件同“1.5”节。用 1.0% 琼脂糖电泳检测产物,用 Axygen 胶回收试剂盒回收目的条带。胶回收产物经 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素的 LB 培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的

白色转化子,采用 T 载体通用引物进行菌落 PCR 检测,将菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.7 序列分析

采用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列同源性分析。

2 结果与分析

2.1 青贮过程中 pH 值及微生物数量的变化过程

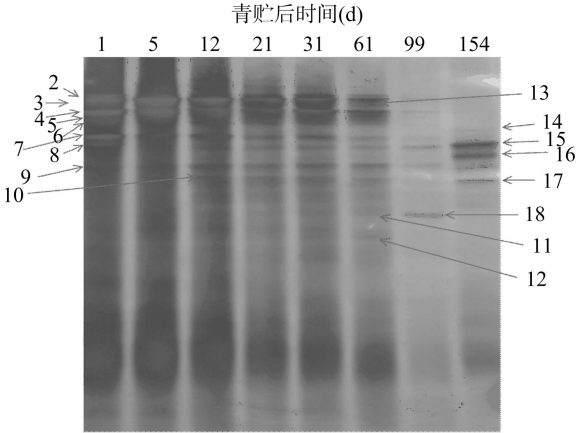
从表 1 可以看出,随着青贮时间的延长,黑麦草与稻草混合青贮 pH 值在青贮初期下降迅速,在青贮 5 d 时 pH 值降为 4.76, 12 d 时 pH 值降为 4.45, 青贮 12 d 以后 pH 值下降缓慢;青贮乳酸菌数量在 5 d 达到最高峰,为 9.50×10^7 个/g,然后逐渐下降,到 21 d 时乳酸菌数量为 8.50×10^6 个/g,到 154 d 时乳酸菌数量只有 5 200 个/g;随着青贮时间的延长,酵母菌数量先降低,青贮后 1 d 酵母菌数量最高,达 7.45×10^5 个/g,到 61 d 时酵母菌数量最少, <100 个/g;随着青贮时间的延长,霉菌数量迅速减少,直到青贮 5 d,霉菌数量小于 100 个/g。

表 1 青贮过程 pH 值及微生物数量的变化

青贮时间 (d)	pH 值	乳酸菌数量 (个/g)	酵母菌数量 (个/g)	霉菌数量 (个/g)
1	5.62	2.30×10^7	7.45×10^5	2.25×10^4
5	4.76	9.50×10^7	2.20×10^5	<100
12	4.45	4.55×10^7	3.20×10^4	<100
21	4.32	8.50×10^6	1 550	<100
31	4.27	3.70×10^6	1 050	<100
61	4.21	3.55×10^6	<100	<100
99	4.10	1.75×10^5	215	<100
154	4.12	5 200	105	<100

2.2 青贮细菌样品 DGGE 分析

从图 1 可以看出,青贮 1 d 时多样性最丰富;条带 2 在青贮后 1 d 存在,青贮 5 d 后该条带消失;条带 3、4、8、9 在青贮 1 至 99 d 持续存在,但随着青贮时间的延长,亮度减弱;条带 5、6、7 从青贮 1 至 61 d 持续存在;条带 10 存在于青贮 12~61 d;条带 11、12、13 仅存在于青贮 61 d;条带 14、15、16、17 仅存在于青贮 154 d;条带 18 仅出现在青贮 99 d。



2~18 表示不同条带;条带 1 切胶后纯化克隆测序无结果,因此未标

图1 稻草与黑麦草混合青贮 DGGE 图谱

回收上述优势条带和变化较明显的条带进行测序分析。由表 2 可知,条带 2 为植物乳杆菌 (*L. plantarum*);条带 3、4、8、9 分别为植物乳杆菌、类肠膜魏斯氏菌 (*Weissella paramesenteroides*)、Uncultured bacterium、Uncultured *Weissella*;条带 5、6、7 分别为类肠膜魏斯氏菌、食蜜魏斯氏菌 (*W. cibaria*)、植物

乳杆菌;条带 10 为短乳杆菌 (*L. brevis*);条带 11、12、13 分别为 *Uncultured Lactobacillus*、植物乳杆菌、米酒乳杆菌 (*L. sake*);条带 14、15、16 分别为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*);条带 17、18 分别为阿耶波多杆菌 (*B. aryabhattai*)、寡氧单胞菌 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*)。

表 2 青贮 DGGE 指纹图谱对应单个条带的序列比对分析

克隆号	登录号	鉴定系统相关基因	相似度 (%)
2	KR816164	<i>Lactococcus plantarum</i>	100
3	KR816164	<i>L. plantarum</i>	100
4	KM392070	类肠膜魏斯氏菌 (<i>Weissella paramesenteroides</i>)	99
5	KM392070	<i>W. paramesenteroides</i>	100
6	KT372702	食蜜魏斯氏菌 (<i>W. cibaria</i>)	98
7	KT025848	<i>L. plantarum</i>	100
8	JQ973633	Uncultured bacterium	99
9	LC055150	Uncultured <i>Weissella</i>	100
10	KR704488	短乳杆菌 (<i>L. brevis</i>)	99
11	LC076863	Uncultured <i>Lactobacillus</i>	98
12	KT025848	<i>L. plantarum</i>	100
13	KR704448	米酒乳杆菌 (<i>L. sake</i>)	98
14	KT720258	地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	100
15	KT720302	<i>B. licheniformis</i>	100
16	KT720258	<i>B. licheniformis</i>	100
17	KT228264	阿耶波多杆菌 (<i>B. aryabhattai</i>)	100
18	CP012900	寡氧单胞菌 (<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>)	100

DGGE 条带的亮度高低代表菌所占数量的多少。由表 1 可知,青贮 1 d 时乳酸菌数量占比较高。由图 1 可见,条带 3 (*L. plantarum*)、条带 4 (*W. paramesenteroides*) 在青贮 5 d 时数量达到最大值;随着青贮时间延长,条带 3、4 的亮度降低,即 *L. plantarum* 与 *W. paramesenteroides* 随着青贮时间延长,数量占比下降;到 154 d 时,条带 3、4 很暗,主要菌群是 *B. licheniformis*、*B. aryabhattai*,这与培养方法计数乳酸菌的结果一致,到青贮 154 d 时,乳酸菌的数量仅为 5 200 个/g(表 1)。可以看出,稻草与黑麦草混合青贮过程中优势菌主要有 *L. plantarum*、*Weissella paramesenteroides*、*W. cibaria*、*L. brevis*,故进行菌剂配伍改良时,可适当提高这 4 种菌的比例。

3 讨论

3.1 稻草与黑麦草混合青贮过程中 pH 值、乳酸菌的变化

pH 值的高低是青贮饲料质量好坏的重要指标,质量良好的青贮要求 pH 值 < 4.5。在本试验中,随着青贮时间的延长,黑麦草、稻草混合青贮 pH 值在青贮初期下降迅速,在青贮 5 d 时 pH 值降为 4.76,12 d 时 pH 值降为 4.45,青贮 12 d 以后 pH 值下降缓慢,61 d 时 pH 值为 4.21,说明青贮质量良好。与玉米青贮相比,黑麦草、稻草混合青贮 pH 值下降没有玉米青贮快。杨云贵等指出,玉米青贮的 pH 值在青贮 2 d 就能下降到 4 以下,然后稳定在 3.5 左右,且全株玉米青贮 pH 值低于秸秆玉米青贮^[9]。即与玉米青贮相比,黑麦草、稻草混合青贮 pH 值下降没有玉米青贮快,可能是因为此试验中黑麦草与水稻秸秆是以质量比 7:3 混贮的,水稻秸秆含量比较高,而水稻秸秆可溶性碳水化合物含量低,导致本试验中 pH 值下降没有玉米青贮快。

青贮中乳酸菌是起主要作用的益生菌,它们在厌氧状态

下将原料中的碳水化合物转化为乳酸。本试验中青贮乳酸菌数量在 5 d 达到最高峰,为 9.50×10^7 个/g,然后逐渐下降,61 d 时维持在 10^6 数量级。此结果与杨云贵等试验中玉米青贮过程中乳酸菌数量变化结果的趋势^[9]相似。但 Li 等指出,凋萎多花黑麦草青贮过程中乳酸菌数量是先增加,到第 7 天时最大,随后降低,然后又增加、降低,而凋萎的羊草青贮过程中乳酸菌数量在第 3 天时已经达到最高峰,随着青贮时间的增加,乳酸菌数量变化得比较小^[11]。

3.2 稻草与黑麦草混合青贮过程中菌群的演替规律

从 DGGE 电泳结果可以看出,青贮 1 d 时多样性最丰富,青贮过程中,细菌种类经历了由多到少的变化且种类也发生了变化。韩吉雨等认为,玉米发酵过程中细菌种类只经历了由多到少的过程,而苜蓿青贮过程中细菌种类没有发生太大的变化^[12]。这可能是由于物料的内部及外部结构不同导致的。

稻草与黑麦草混合青贮过程中优势菌主要有 *L. plantarum*、*W. paramesenteroides*、*W. cibaria*、*L. brevis*。*L. plantarum* 是同型乳酸菌^[13],是农作物青贮发酵过程中的主要优势菌^[14]。Ennahar 等指出,*L. plantarum* 是水稻青贮的主要优势菌^[15]。*W. Paramesenteroides* 是传统发酵豆制品中的优势乳酸菌之一^[16]。*W. Paramesenteroides*、*L. brevis* 也是水稻秸秆发酵全混合日粮 (TMR) 和玉米秸秆发酵 TMR 中的优势乳酸菌^[17]。*W. Cibaria* 是水稻青贮中的优势菌,Pang 等研究表明,水稻青贮的主要菌群是 *W. cibaria*、*W. confusa*、*L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. plantarum*^[18]。*L. brevis* 是玉米秸秆的主要优势菌,占 23.7%^[19]。而玉米秸秆青贮过程中主要的优势菌是 *Lactococcus plantarum*、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactococcus lactis*^[7]。刘建新认为,青贮起始阶段,大肠杆菌大量增殖,直到

第 3 天数量减少,被乳球菌(肠球菌、明串球菌、片球菌、四联球菌)代替,然后又被生长较慢、产酸较多的乳杆菌代替^[20-21]。这与本试验过程中 *L. brevis* 出现在青贮 12 ~ 61 d 及 *L. sake* 仅出现在青贮 61 d 的结果是一致的。但是本试验在整个青贮过程中没有发现有乳球菌的存在。McEniry 等研究发现,肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)是青贮第 2、6 天的主要优势菌群^[22]。Langston 等也指出,在青贮早期存在明串珠菌属(*Leuconostoc*)菌^[23]。但 Li 等指出,水生拉恩菌(*Rahnella aquatilis*)、肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)是多花黑麦草凋萎整个青贮过程中都存在的优势菌,*Enterococcus faecium* 仅存在于青贮第 7、28 天,而青贮第 120 天时出现 *Pediococcus pentosaceus*、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)这 2 种新的菌^[11]。这可能是由于青贮本身材料的不同或添加乳酸菌等添加剂造成的青贮过程中菌群多样性的不同。李雁冰等的研究^[24]也证实了这一点。

4 结论

将 DGGE、16S rRNA 序列分析技术结合,能够非常有效地研究稻草与黑麦草混合青贮细菌的遗传多样性和组成的变化,进一步将其与发酵特性、传统培养等研究手段一起应该能更好地揭示青贮微生物的功能。

参考文献:

- [1] Wang Y J, Bi Y Y, Gao C Y. The assessment and utilization of straw resources in China [J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9 (12): 1807 - 1815.
- [2] 许能祥, 丁成龙, 顾洪如, 等. 添加乳酸菌和米糠对水稻秸秆青贮品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(6): 1308 - 1312.
- [3] 许庆方, 韩建国, 玉柱. 青贮渗出液的研究进展[J]. 草业科学, 2005, 22(11): 90 - 95.
- [4] 李君临, 张新全, 玉柱, 等. 多花黑麦草与水稻秸秆混合青贮品质的研究[J]. 草地学报, 2014, 22(4): 915 - 918.
- [5] Pitt R E, Muck R E, Leibensperger R Y. A quantitative model of the ensilage process in lactate silages[J]. Grass & Forage Science, 2006, 40(3): 279 - 303.
- [6] 张大伟, 陈林海, 朱海霞, 等. 青贮饲料中主要微生物对青贮品质的影响[J]. 饲料研究, 2007(3): 65 - 68.
- [7] 包慧芳, 王炜, 王宁, 等. 玉米秸秆青贮过程中优势细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1247 - 1251.
- [8] 詹发强, 包慧芳, 崔卫东, 等. 玉米青贮过程中乳酸菌动态变化[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 834 - 838.
- [9] 杨云贵, 张越利, 杜欣, 等. 2 种玉米青贮饲料青贮过程中主要微生物的变化规律研究[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(3): 397 - 403.
- [10] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695 - 700.
- [11] Li Y, Nishino N. Changes in the bacterial community and composition of fermentation products during ensiling of wilted Italian ryegrass and wilted Guinea grass silages[J]. Animal Science Journal, 2013, 84(8): 607 - 612.
- [12] 韩吉雨, 杨凯, 侯先志, 等. 玉米和苜蓿青贮发酵体系中菌群多样性的 PCR - DGGE 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 526 - 532.
- [13] Garde A, Jonsson G, Schmidt A S, et al. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis* [J]. Bioresource Technology, 2002, 81(3): 217 - 223.
- [14] Cai Y, Benno Y, Ogawa M, et al. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(3): 520 - 526.
- [15] Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 444 - 451.
- [16] 陈浩, 樊游, 陈源源, 等. 传统发酵豆制品中原核微生物多样性的研究[J]. 食品工业科技, 2011(9): 230 - 232.
- [17] Tu T T M, Huu V N, Nishino N. A pilot examination of the fermentation products, aerobic stability and bacterial community of total mixed ration silage produced in Vietnam[J]. Grassland Science, 2014, 60(1): 63 - 68.
- [18] Pang H, Qin G, Tan Z, et al. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(3): 235 - 241.
- [19] Pang H, Zhang M, Qin G, et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers[J]. Animal Science Journal, 2011, 82(5): 642 - 653.
- [20] 刘建新. 青贮饲料质量评定标准(试行)[J]. 中国饲料, 1996, 21: 5 - 7.
- [21] 华鹤良, 张军, 杨仁琴, 等. 乳酸菌复壮、鉴定及其优良菌株筛选[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, 34(4): 27 - 31.
- [22] McEniry J, O'kiely P, Clipson N J, et al. Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(2): 359 - 371.
- [23] Langston C W, Wiseman H G, Gordon C H, et al. Chemical and bacteriological changes in grass silage during the early stages of fermentation. II. Bacteriological changes[J]. Journal of Dairy Science, 1962, 45(5): 618 - 624.
- [24] 李雁冰, 玉柱, 孙娟娟. 不同乳酸菌添加剂对青贮黑麦草和青贮玉米微生物群集的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(2): 387 - 393.