

黄贮对玉米秸秆品质及微生物多样性的影响

刘鑫阳, 田瑞华* (内蒙古农业大学生命科学院, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要 [目的]研究黄贮对玉米秸秆的品质及微生物多样性的影响。[方法]采用现行有效的测定方法及高通量测序,对黄贮玉米秸秆饲料的营养品质及微生物进行了研究。[结果]经过98 d的黄贮,玉米秸秆的总酸含量提高了31.62%,粗纤维含量降低了39.92%,粗蛋白含量提高了8.53%,细菌群落丰富度和多样性明显降低,细菌群落组成由初始的蓝藻科某些属为主导变为以乳酸菌为主导。[结论]黄贮有效改善了秸秆饲料的营养品质及微生物群落组成。

关键词 黄贮;高通量测序;微生物多样性;营养品质

中图分类号 S816.6 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)19-0197-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.19.057



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Yellow-storage on the Quality and Microbial Diversity of Corn Straw

LIU Xin-yang, TIAN Rui-hua (College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010010)

Abstract [Objective] To study the effects of yellow-storage on the quality and microbial diversity of corn straw. [Method] The nutritional quality and microbial diversity of yellow-storage corn straw feed were analyzed by using current effective methods and high throughput sequencing. [Result] The results showed that the total acid content of maize straw increased by 31.62%, cellulose content decreased by 39.92%, crude protein content increased by 8.53% after 98 days of yellow-storage. The richness and diversity of bacterial community decreased obviously, and the composition of bacterial community changed from initial miscellaneous bacteria to lactobacillus-dominated structure distribution. [Conclusion] The nutritional quality and microbial community composition of straw feed were effectively improved by yellow-storage.

Key words Yellow-storage; High throughput sequencing; Microbial diversity; Nutritional quality

随着人们生活水平的不断提高,对肉制品的需求也不断增加,使得畜牧业的发展越来越快,但同样也面临着自然环境变化、天然草场产量下降等问题,开发新的能源已成为学者们热切关注的问题。我国秸秆资源非常丰富,年产量高达7亿多 $t^{[1]}$,产量占世界总产量的20%~30%,但用于制作饲料的量不到20%。若将这么多的秸秆焚烧会造成严重的环境污染,堆积会造成不必要的浪费,秸秆还田也会增加农作物的倒伏以及病虫害的危害。这些秸秆如果能被合理利用,制成饲料,不仅解决了资源浪费和秸秆焚烧带来的环境污染问题,而且解决了畜牧发展中存在的一些问题。玉米秸秆主要是由木质素、纤维素和半纤维素组成,其质地粗硬,营养价值低,影响家畜的消化率和采食量。微生物发酵可以显著降低玉米秸秆中半纤维素和纤维素的含量^[2],提高饲料作物的消化率^[3]。通过微生物发酵既改善了玉米秸秆的适口性,也提高了玉米秸秆的营养品质。

高通量测序技术是近年来新兴发展起来的免培养分子生物学技术,又称新一代测序技术^[4]。因为高通量测序具有读数长、效率高、灵敏度高等特点,可最大限度地保留菌群原有的群落组成和分布特征,是一个研究微生物多样性的重要手段^[5-7]。目前,高通量测序技术在人类基因组、青贮微生物、肠道微生物、土壤微生物、植物根际及内生菌等多种环境微生物生态的研究中都有应用^[8-13]。高通量测序技术虽然已被广泛应用,但该技术黄贮中应用得较少,且目前对黄贮饲料中菌群结构的研究基本处于空白。笔者利用高通

量测序技术分析了黄贮对玉米秸秆中微生物多样性的影响,结合现行有效的方法分析了黄贮对玉米秸秆中总酸含量、粗纤维含量及粗蛋白含量的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 超低温冰箱 DW-86L388A(青岛海尔特种电器有限公司)、移液器 Eppendorf N13462C(Eppendorf)、小型离心机 Eppendorf 5430 R(Eppendorf)、高速台式冷冻离心机 Eppendorf 5424R(Eppendorf)、超微量分光光度计 NanoDrop2000(Thermo FisherScientific)、电泳仪 DYY-6C(北京市六一仪器厂)、MISEQ 测序仪 Illumina Miseq(Illumina)、酶标仪 BioTek ELx800(Biotek)。

1.2 主要试剂 DNA 抽提试剂盒、2% agarose gels、FastPfu Polymerase、AxyPrep DNA GelExtraction Kit、MiSeqplatform、FastDNASPINKitforSoil、酚酞、氢氧化钠、纤维滤袋、浓硫酸、无水葡萄糖、纤维滤袋、混合催化剂、混合指示剂、硼酸、盐酸、DNS 试剂。

1.3 试验方法

1.3.1 采样方法。玉米秸秆黄贮池共3个,均为长、宽、高各2m的池子,玉米秸秆黄贮时间为98d,分别在玉米秸秆黄贮封窖前及98d黄贮结束过后进行取样。在黄贮池的1m深处分别取5个样,将取出的玉米秸秆样品进行充分混合,然后平均分成3份放入自封袋中,置于-80℃冰箱中保存。

1.3.2 黄贮秸秆样品的品质指标测定。玉米秸秆黄贮过程中品质指标的测定参照现行有效的分析方法^[14-16]。

1.3.3 Illumina Miseq 高通量测序。

1.3.3.1 DNA 抽提与 PCR 扩增。参照 FastDNA® SPIN Kit for soil 试剂盒说明书对玉米秸秆样品进行总 DNA 提取,并利用 NanoDrop2000 对 DNA 的纯度和浓度进行检测,利用

基金项目 内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目。

作者简介 刘鑫阳(1993—),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,研究方向:微生物发酵及发酵产物分离与鉴定。*通信作者,副教授,从事发酵工程技术应用研究。

收稿日期 2019-04-07;修回日期 2019-04-18

806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')和338F(5'-ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3')引物对V3~V4可变区进行PCR扩增。

1.3.3.2 Illumina Miseq 测序。利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司),将原始数据上传至NCBI网站进行比对。

1.3.3.3 数据处理。原始测序的序列使用Trimmomatic软件进行质控,并使用FLASH软件进行拼接。

2 结果与分析

2.1 黄贮玉米秸秆的品质指标测定 为了解黄贮玉米秸秆的表型特征,对黄贮玉米秸秆的总酸含量、粗纤维含量、粗蛋

白含量这3个重要品质指标进行测定,测定结果见表1。

由表1可以看出,通过黄贮发酵的玉米秸秆总酸含量由初始的8.57 g/kg升高到11.28 g/kg。与未进行黄贮发酵的玉米秸秆相比,经过黄贮发酵的玉米秸秆总酸含量提高了31.62%,这说明黄贮显著提高了秸秆中的总酸含量;粗纤维含量由初始的34.47%降低到20.71%,与未进行黄贮发酵的玉米秸秆相比,经过黄贮发酵后的玉米秸秆粗纤维含量降低了39.92%,说明黄贮显著降低了玉米秸秆中粗纤维的含量;粗蛋白含量由初始的3.87%提高到4.20%,与未进行黄贮发酵的玉米秸秆相比,经过黄贮发酵的玉米秸秆粗蛋白含量提高了8.53%,说明黄贮有效提高了玉米秸秆中粗纤维的含量。

表1 黄贮玉米秸秆品质指标的测定结果

Table 1 Determination results of quality indicators of corn straw by yellow storage

黄贮池号 Pond number of yellow storage	初始总酸含量 Initial total acid content//g/kg	黄贮结束总酸含量 Total acid content at the end of yellow storage//g/kg	初始粗纤维含量 Initial crude fiber content %	黄贮结束粗纤维含量 Initial crude fiber at the end of yellow storage//%	初始粗蛋白含量 Initial crude protein content %	黄贮结束粗蛋白含量 Crude protein content at the end of yellow storage//%
1#	8.65	11.32	34.43	20.79	3.89	4.21
2#	8.50	11.01	34.36	21.03	3.80	4.17
3#	8.57	11.50	34.62	20.31	3.92	4.22
平均值 Mean	8.57	11.28	34.47	20.71	3.87	4.20

2.2 玉米秸秆黄贮的 Illumina Miseq 高通量测序

2.2.1 黄贮玉米秸秆样品中细菌16S rRNA的Illumina测序的稀释曲线。稀释曲线(rarefaction curve)主要利用各样本在不同测序深度时的微生物 α 多样性指数构建曲线,以此反映各样本在不同测序数据量时的微生物多样性,也可以用来说明样本测序数据量的合理性。稀释曲线采用对序列进行随机抽样的方法,以抽到的序列数与它们对应的物种(OTU)数目或多样性指数,构建稀释曲线。该研究采用Shannon-Wiener指数,选择97%相似度的OTU水平,利用mothur计算不同随机抽样下的Shannon-Wiener多样性指数,利用R语言工具绘制稀释曲线。当曲线趋向平坦时,说明测序数据量合理,更多的数据量只会产生少量新的物种,反之则表明继续测序还可能产生较多的新物种。

图1为黄贮玉米秸秆样品的细菌稀释曲线,随着样本序列数的增加,检测到OTU数量的增加量逐渐减小,曲线趋于平坦,这说明该试验测序的数据量比较合理,通过检测获得了样品细菌群落中绝大多数OTU水平上的物种。

2.2.2 黄贮玉米秸秆样品中细菌的 α -多样性。通过chao指数、Shannon-Wiener指数、物种覆盖度指数对黄贮玉米秸秆样品中细菌的 α 多样性进行分析。chao指数是描述物种丰富度chao1指数,是用chao1算法估计样本中所含OTU数目的指数,用来估计物种总数;Shannon-Wiener指数是反映多样性的指数,其值越高说明群落多样性越高;物种覆盖度指数(coverage)是反映群落覆盖度的指数,其数值越高则样本中序列被测出的概率越高,而没有被测出的概率越低,该指数反映此次测序结果是否代表样本中微生物的真实情况。

从表2可以看出,黄贮玉米秸秆样品中细菌的物种覆盖度均在0.99以上,说明样本中序列被测出的概率很高,且此

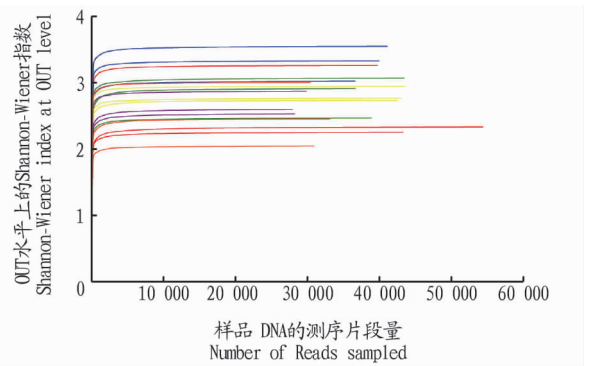


图1 样品中细菌稀释曲线

Fig.1 Bacterial dilution curve in samples

次试验数据代表了样本中微生物的真实情况。经过98 d黄贮后,3个黄贮池中玉米秸秆细菌的Shannon-Wiener指数和chao指数均显著降低,说明黄贮降低了玉米秸秆中细菌的丰富度和多样性。

表2 样品中细菌的 α -多样性

Table 2 Alpha diversity of bacteria in the samples

样品编号 Sample No.	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	chao 指数 chao index	物种覆盖度 Coverage
N1_0	2.33	1 021.41	0.996
N1_98	2.05	647.26	0.995
N2_0	2.45	822.54	0.996
N2_98	2.25	806.29	0.994
N3_0	3.26	739.10	0.996
N3_98	3.00	517.80	0.996

2.2.3 黄贮玉米秸秆样品中细菌群落分类学分析。

2.2.3.1 黄贮玉米秸秆中细菌群落在门水平上的结构分布。通过与Silva数据库进行对比发现,玉米秸秆初始的细

菌群落由 19 个门组成,经过 98 d 黄贮后玉米秸秆中细菌群落变为 18 个门。

从图 2 可以看出,玉米秸秆初始的细菌群落中蓝藻门(Cyanobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)占据明显的优势地位,此外还有拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)等一些相对丰度较低的细菌门类。黄贮 98 d 后的细菌群落中厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门占据明显的优势地位,此外还有拟杆菌门和放线菌门等相对丰度较低的门类。这说明黄贮明显改变了细菌在门水平上的结构分布。

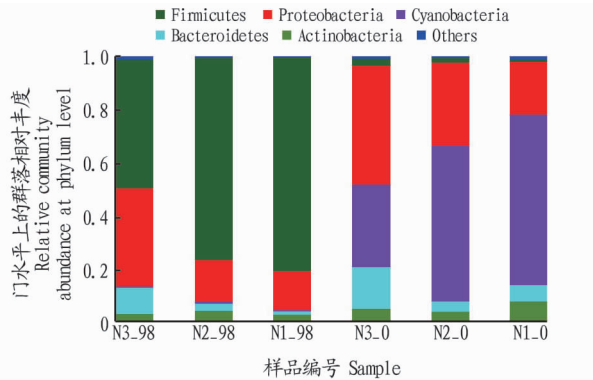


图 2 样品中细菌群落门水平上的组成

Fig. 2 The composition of bacterial community in the samples at phylum level

2.2.3.2 黄贮玉米秸秆中细菌群落在属水平上的结构分布。通过与 Silva 数据库进行对比发现,玉米秸秆初始的细菌群落由 349 个属组成,经过 98 d 黄贮后玉米秸秆中细菌群落变为 323 个属。

从图 3 可以看出,玉米秸秆初始的细菌群落中蓝藻科的某些属占据明显的优势地位,此外还有泛菌属、鞘脂单胞菌属、根瘤菌属等一些相对丰度较低的属。黄贮 98 d 后的细菌群落中,乳杆菌属代替了蓝藻科某些属的优势地位,成为优势菌属,此外还有片球菌、乳球菌等一些相对丰度较低的菌属。由黄贮玉米秸秆中细菌群落在属水平上的结构分布可以看出,经过 98 d 的黄贮,秸秆饲料中细菌群落的组成由一些杂菌变为乳酸菌主导。乳酸菌分为同型发酵乳酸菌、异型发酵乳酸菌和兼性异型发酵乳酸菌。其中,同型发酵乳酸菌可以快速降低 pH、增加乳酸菌数量和乳酸含量;专性异型发酵乳酸菌具有增加有氧稳定性的作用;兼性异型发酵乳酸菌具有二者联合的作用^[17]。

3 结论

总酸含量是衡量玉米秸秆黄贮发酵秸秆品质的一个重要指标,相对较高的总酸含量不仅可以抑制黄贮发酵秸秆中杂菌的生长,而且可以增加黄贮发酵秸秆的有氧稳定性。玉米秸秆饲料中纤维素的存在会影响饲料的适口性,含有很多不能被动物消化和利用的物质,因此降低玉米秸秆中的纤维含量是必要的;黄贮饲料中蛋白的存在可以有效改善饲料的营养价值,从而提高饲料的饲用价值,因此饲料中蛋白含量是衡量黄贮饲料品质的一个重要指标。Huang 等^[18]研究发现秸秆经青贮后总酸的含量显著提高,有效抑制了秸秆中有

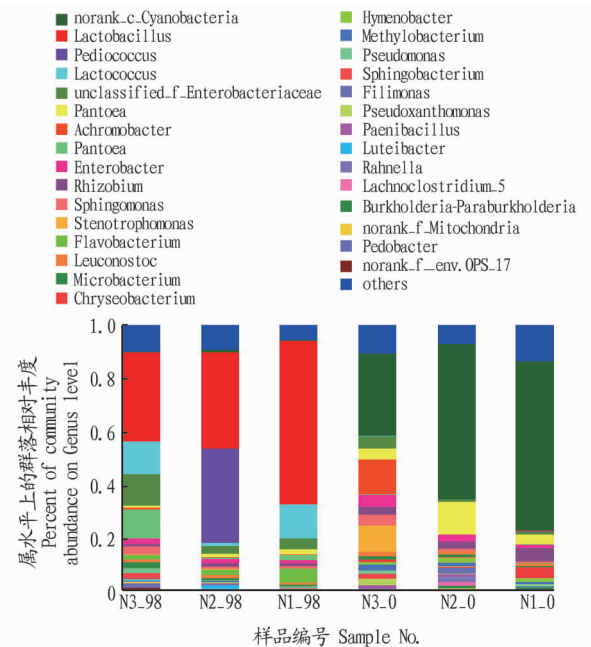


图 3 样品中细菌群落属水平上的组成

Fig. 3 The composition of bacterial community in samples at genus level

害菌的生长,提高饲料的品质。Hu 等^[19]、Nsereko 等^[20]、Zayed 等^[21]研究发现青贮可以显著提高秸秆饲料的干物质、粗蛋白等含量以及纤维素的降解率。该研究发现玉米秸秆经黄贮后有效提高了玉米秸秆的总酸及粗蛋白的含量,显著降低了秸秆的粗纤维含量,提高了玉米秸秆的营养品质,这与上述研究结果相似。

经过黄贮发酵,玉米秸秆中的细菌丰富度和多样性都有所降低。Li 等^[22]对丁香和黑麦草进行青贮,结果表明青贮降低了丁香和黑麦草饲料的细菌丰富度,与该研究结果相似。Ogunade 等^[9]研究发现苜蓿青贮饲料细菌群落中 74.1% 和 20.4% 的细菌分别属于厚壁菌门和变形菌门。Ogunade 等^[23]对玉米秸秆进行青贮,通过对青贮饲料的细菌多样性分析表明青贮可以改变饲料中的细菌群落组成。结果表明,玉米青贮饲料中涉及乳酸发酵的细菌群落中,98.3% 属于厚壁菌门,96.5% 属于乳酸杆菌属,与该研究结果相似。

通过对黄贮玉米秸秆饲料的品质指标进行分析,发现黄贮有效改善了秸秆饲料中总酸、粗纤维和粗蛋白的含量。通过对黄贮玉米秸秆饲料的微生物进行分析,发现黄贮显著降低了秸秆饲料中细菌群落的丰富度和多样性,并明显改变了玉米秸秆饲料中细菌群落的结构组成。

参考文献

- [1] 霍丽丽,吴娟娟,赵立欣,等.华北平原地区玉米秸秆连续供应模型的建立及应用[J].农业工程学报,2016,32(19):203-210.
- [2] GUO H W, CHANG J, YIN Q Q, et al. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation [J]. Bioresource technology, 2013, 148: 361-365.
- [3] HUNT C W, KEZAR W, HINMAN D D, et al. Effects of hybrid and ensiling with and without a microbial inoculant on the nutritional characteristics of whole-plant corn [J]. Journal of animal science, 1993, 71(1): 38-43.
- [4] 令利军,何楠,白雪,等.基于高通量测序的玉米秸秆自然发酵过程中细菌菌群结构特征[J].兰州大学学报(自然科学版),2017,53(4):526-533.

- [5] 王玉荣,折米娜,刘康玲,等. 基于 MiSeq 高通量测序技术内蒙古地区酸粥细菌多样性研究[J]. 食品工业科技,2018,39(19):124-129.
- [6] 魏军,赵志军. 下一代测序技术在分子诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2013,5(3):145-151.
- [7] HOLT K E,PARKHILL J,MAZZONI C J,et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi[J]. Nature genetics,2008,40(8):987-993.
- [8] REUTER J A,SPACEK D V,SNYDER M P. High-throughput sequencing technologies[J]. Molecular cell,2015,58(4):586-597.
- [9] OGUNADE I M,JIANG Y,PECH CERVANTES A A,et al. Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing;Effects of *Escherichia coli*, O157:H7 and silage additives[J]. Journal of dairy science,2018,101(3):2048-2059.
- [10] LONG L L,GUO J J,LI P,et al. Bacterial diversity in *Bercoea Cruentata* gut described using high-throughput sequencing[J]. Forensic science international genetics supplement series,2015,5:e479-e481.
- [11] DUAN D Y,LIU G H,CHENG T Y,et al. Microbial population analysis of the midgut of *Melophagus ovinus* via high-throughput sequencing[J]. Parasites & vectors,2017,10(1):1-7.
- [12] FAN T L,SUN Y X,PENG J J,et al. Combination of amplified rDNA restriction analysis and high-throughput sequencing revealed the negative effect of colistin sulfate on the diversity of soil microorganisms[J]. Microbiological research,2018,206:9-15.
- [13] HUANG Y H. Comparison of rhizosphere and endophytic microbial communities of Chinese leek through high-throughput 16S rRNA gene Illumina sequencing[J]. Journal of integrative agriculture,2018,17(2):359-367.
- [14] 中国食品发酵工业研究院. 食品中总酸的测定:GB/T 12456—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [15] 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所(国家饲料质量监督检验中心). 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法:GB/T 6432—2018[S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- [16] 农业部饲料质量监督检验测试中心. 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法:GB/T 6434—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [17] 牛化欣,常杰,胡宗福,等. 青贮微生物的发掘及其应用的研究进展[J]. 动物营养学报,2018,30(11):4279-4285.
- [18] HUANG J L,WANG L K,DAI S F. Effects of previously fermented juice on nutritive value and fermentative quality of rice straw silage[J]. Journal of northeast agricultural university,2013,20(2):48-52.
- [19] HU W,SCHMIDT R J,MCDONELL E E,et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents[J]. Journal of dairy science,2009,92(8):3907-3914.
- [20] NSERERKO V L,SMILEY B K,RUTHERFORD W M,et al. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber[J]. Animal feed science and technology,2008,145(1/2/3/4):122-135.
- [21] ZAYED M S. Enhancement the feeding value of rice straw as animal fodder through microbial inoculants and physical treatments[J]. International journal of recycling of organic waste in agriculture,2018,7(2):117-124.
- [22] LI P,ZHANG Y,GOU W L,et al. Silage fermentation and bacterial community of bur clover,annual ryegrass and their mixtures prepared with microbial inoculant and chemical additive[J]. Animal feed science and technology,2019,247:285-293.
- [23] OGUNADE I M,JIANG Y,KIM D H,et al. Fate of *E. coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives[J]. Journal of dairy science,2017,100(3):1780-1794.

(上接第 196 页)

3 讨论与结论

3.1 合江县植物蕴藏丰富,珍稀物种急需保护 合江县独特的地理气候优势为野生植物提供良好的生长繁殖温室,此次调查过程中,不仅发现合江地区植物品种多,数量上也有一定的优势,特别是自然旅游地如笔架山、天堂坝等未经过多的人工改造,对当地的野生物种资源都有一定程度上的保护。但仍有一些野生品种如八角莲、合柱兰、楼梯草等与以往相比极少出现,甚至面临濒危。因此,需要当地政府部门和地方居民加强濒危物种保护意识,防止因耕地和造房而导致植被破坏,减少乱砍乱伐,保持合江县药用植物优势。

3.2 中药材市场管理不规范,大部分栽培药材尚未形成地方品牌 目前,合江地区的中药材市场存在的问题依然是中药材市场未形成体系,大部分收购栽培药材的机构分布零散,也存在药农在集市零售中药的情况,收购渠道不够统一规范,未形成产业链,导致中药材市场发展不前甚至稍显混乱。栽培药材方面,合江金钗石斛为中国国家地理标志产品^[10],但同时合江青果、佛手、枳壳枳实等也是当地发展的

较好的地道药材。因此,需要规范化种植,科学培育,做到产学研相结合,亦能将这些优势药材打造成为合江的名片,带动合江经济更快发展。

参考文献

- [1] 李晨芹,王福楷,任梦星,等. 合江县金钗石斛产业发展的 SWOT 分析[J]. 南方农业,2019,13(16):25-27,33.
- [2] 陈淮,王世江. 加快合江县绿色荔枝产业发展的技术措施[J]. 南方农业,2015,9(3):106-107.
- [3] 吴贵阳,李燕梅. 抓机遇建金钗石斛基地 促泸州中药产业发展[J]. 泸州科技,2015(2):22-23.
- [4] 郭兰萍,陆建伟,张小波,等. 全国中药资源普查技术规范制定[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):937-942.
- [5] 刘华,李明,李吉宁. 第四次中药资源普查外业调查技术方法探讨[J]. 宁夏农林科技,2018,59(3):30-31,34.
- [6] 刘德旺,青梅,于娟,等. 标准化操作规程在腊叶标本制作中的应用研究[J]. 内蒙古医科大学学报(教育版),2014,36(S2):971-974.
- [7] 黄璐琦,张小波. 全国中药资源普查的信息化工作[J]. 中国中药杂志,2017,42(22):4251-4255.
- [8] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:3-385.
- [10] 合江金钗石斛地理标志产品保护顺利通过专家技术组审查[J]. 泸州科技,2015(4):32.