



许书林, 吴琼, 王馨悦, 高游慧, 张越, 王小芬. 基于农用酵素生产降本增效的复合菌系筛选及接种效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(06): 120-128.
XU Shulin, WU Qiong, WANG Xinyue, GAO Youhui, ZHANG Yue, WANG Xiaofen. Study on screening and inoculation effect of composite strains based on cost reduction and efficiency improvement of agricultural Jiaosu production[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(06): 120-128.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.06.13

基于农用酵素生产降本增效的复合菌系筛选及接种效果研究

许书林^{1,2} 吴琼² 王馨悦² 高游慧² 张越² 王小芬^{1,2*}

(1. 中国农业大学 三亚研究院, 海南 三亚 572000;

2. 中国农业大学 农学院, 北京 100193)

摘要 为开发低成本、高效率的农用酵素接种菌剂, 并探明其作用效果, 采用限制性继代培养法, 分别利用改良 MRS(M) 和红糖(H) 培养基对酵素微生物进行培养, 获得 2 组乳酸菌复合菌系, 分别命名为 MLA 1 和 HLA 1, 并将这 2 种菌系接种到农用酵素发酵体系中, 测定继代培养体系的 pH 和有机酸含量, 复合菌系的微生物结构和多样性, 接种后发酵液的细菌和乳酸菌数量、pH、有机酸含量及对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 的抑制效果等指标。结果表明: MLA 1 和 HLA 1 均主要由乳酸菌属(*Lactobacillus*) 和醋酸菌属(*Acetobacter*) 构成; 在限制性培养中, MLA 1 相比 HLA 1 产酸升高 40%, 乳酸菌丰度升高 5%, 而 HLA 1 的 Chao、Faith 和 Shannon 指数高于 MLA 1, 表明其微生物多样性更高; 接种到酵素发酵体系中, MLA 1 和 HLA 1 的接种分别使酵素发酵过程的乳酸产量升高 251% 和 295%, 乳酸菌在细菌中的占比分别升高 12% 和 16%, 对尖孢镰刀菌的抑菌率均升高 15% 以上。综上, HLA 1 和 MLA 1 的接种效果接近, 考虑到成本, 利用红糖培养基筛选复合菌系(HLA 1) 具有更高的应用价值, 有助于在农用酵素大规模生产中的降本增效。

关键词 农用酵素; 红糖培养基; 乳酸菌; 生态投入品

中图分类号 X712

文章编号 1007-4333(2024)06-0120-09

文献标志码 A

Study on screening and inoculation effect of composite strains based on cost reduction and efficiency improvement of agricultural Jiaosu production

XU Shulin^{1,2}, WU Qiong², WANG Xinyue², GAO Youhui², ZHANG Yue², WANG Xiaofen^{1,2*}

(1. Sanya Institute of China Agricultural University, Sanya 572000, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To develop low cost and high efficiency agricultural Jiaosu inoculants and investigate their effects, the restricted continuous subculture method was adopted to culture Jiaosu microorganisms by using the improved MRS (M) and brown sugar (H) medium, respectively. Two groups of lactic acid bacteria composite strains named MLA 1 and HLA 1 were obtained. The two groups strains were inoculated into agricultural Jiaosu fermentation system. After the restricted continuous subculturing, the volatile fatty acid concentration, pH and the microbial structure of the strains were measured. The copies of *16s rRNA* gene bacteria and lactic acid bacteria, pH, volatile fatty acid concentration and the inhibition effect on *Fusarium oxysporum* of inoculated Jiaosu were determined. The results showed that: Both MLA 1 and

收稿日期: 2023-12-10

基金项目: 十四五重点研发计划(2021YFD1901103); 三亚崖州湾科技城博士研究生科研创新基金(HSPHDSRF-2023-05-014)

第一作者: 许书林(ORCID:0009-0005-5300-9003), 博士研究生, E-mail: S20193010106@cau.edu.cn

通讯作者: 王小芬(ORCID:0000-0003-3543-1073), 教授, 主要从事生物质资源农用转化的研究, E-mail: wxiaofen@cau.edu.cn

HLA 1 were mainly composed of *Lactobacillus* and *Acetobacter*. In the MLA 1 culture, the acid production increased by 40% and lactobacillus abundance by 5% compared with those of HLA 1. The Chao, Faith, and Shannon indices of HLA 1 were all higher, indicating higher microbial diversity. After inoculation with MLA 1 and HLA 1, the lactic acid yield of Jiaosu increased by 251% and 295%, respectively, the proportion of lactic acid bacteria in the bacteria increased by 12% and 16%, respectively, and the inhibitory rate against *F. oxysporum* increased by more than 15%. In conclusion, the inoculation effects of HLA 1 and MLA 1 are similar. Considering the cost, the brown sugar medium is more suitable for screening inoculants and conducive to achieve the low cost and high quality during the large-scale production of agricultural Jiaosu.

Keywords agricultural Jiaosu; brown sugar medium; lactic acid bacteria; ecological additive

近年来,随着人口的增长和生活水平的提高,对粮食的需求逐渐增加,石油农业暂时解决了粮食安全隐患,但导致了土壤污染,农残超标,面源污染等一系列环境问题,已经严重危害人体健康^[1]。面对当前集约化农业系统对气候和生态造成的风险,以及水体污染和化肥农药过度使用对食品安全构成的威胁,减少化学投入品和发展生态农业已越来越受到相关部门的重视^[2-3]。生态投入品在污染控制和资源循环上发挥着重要作用。在苜蓿青贮过程中,接种乳酸菌复合系可使乳酸菌快速繁殖,产生大量乳酸,使pH迅速降低,提高青贮成功率,改善青贮饲料的发酵品质^[4];在水稻秸秆发酵进程中接种复合菌系,可以有效促进低温发酵进程^[5]。接种菌剂可使有益菌群在发酵系统中迅速繁殖,占据优势生态位,从而提高发酵效率、缩短发酵周期,保证发酵的稳定性^[6-7]。然而复合菌系的培养和扩繁对于营养和环境的要求往往较为苛刻,这增加了生态产品的生产成本,限制了其在规模化生产中的应用。

农用酵素是一种富含有机酸、有益菌及天然植物激素等成分的酸性产物,目前已作为叶面肥、滴灌肥、生物农药和分解菌剂等广泛应用于生态农业生产,在建立良好的土壤微生态环境、促进植物生长等方面发挥重要的生态综合效应^[8-10]。由于主要以废弃果蔬为原料且制作工艺简单,农用酵素相比大多数菌剂具有极大的成本优势。但也因为对原料和制作工艺的要求低,在标准范围内,不同原料或方法制作的农用酵素在微生物群落和功能上有很大的差异^[11],导致农用酵素的品质不稳定。农用酵素作为添加剂时主要通过“酸菌协同”的机制来实现对目标微生物群落的改良和代谢的调控^[6,10],而这个过程有赖于乳酸、乙酸和乳酸菌的共同作

用^[12-13]。因此,提高发酵过程中的乳酸、乙酸产量和乳酸菌丰度对于酵素的品质至关重要。MRS培养基是乳酸菌最常用的限制性培养基^[14],通过改良MRS培养基能够富集和筛选以乳酸菌为主的高效产酸菌系,可以作为提高酵素发酵品质的接种菌剂^[15]。但是合成培养基较高的成本限制了其在生产中的应用,寻找成本更低更易获取的天然材料进行替代是解决该问题的一种思路。且天然培养基有时更有利于菌株生长和代谢^[16-17]。在生产中,由于红糖成本低且富含碳源和矿物质而常被用于菌种扩繁,红糖成本远低于MRS培养基,具有大规模培养接种菌系的潜力,但是利用红糖作为培养基对于乳酸菌继代培养和筛选效果的研究尚未见报道。本研究通过改良MRS和红糖培养基的限制性继代培养筛选乳酸菌复合菌系并将这些菌系用于发酵接种,测定继代培养体系的pH和有机酸含量、复合菌系的微生物结构和多样性、接种后对发酵液细菌数量、理化性质和对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑制效果等指标,旨在开发低成本、高效率的农用酵素接种菌剂,并探明其作用效果,以为农用酵素大规模生产的品质控制和工艺优化提供建议。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验使用的农用酵素来自中国农业大学农学院生物质工程中心实验室,具体制作方法如下:从超市获取红糖和废弃水果,将红糖:废弃水果:自来水按照质量比1:3:10混合放于10 L发酵罐中,(25±2)℃避光厌氧发酵90 d^[10],选取发酵品质良好的酵素作为接种物。

改良MRS培养基(C-MRS)配料为:10 g红

糖、2 g 葡萄糖、1 g 蛋白胨、0.5 g 牛肉膏、0.4 g 酵母粉、0.2 g 柠檬酸三铵、0.5 g 乙酸钠、0.2 g K_2HPO_4 、0.02 g $MgSO_4$ 、0.005 g $MnSO_4$ 、0.1 mL 吐温 80、90 mL ddH₂O, 115 °C 灭菌 20 min; 红糖培养基(HT) 配料为: 10 g 红糖、90 mL ddH₂O, 115 °C 灭菌 20 min; PDA 培养基按照 Zhang 等^[10]的方法配置。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌复合菌系的筛选

分别取 18 mL C-MRS 和 HT 培养液装入 20 mL 螺口离心管, 再加入农用酵素接种物 2 mL, 于 35 °C 静置培养。培养 48 h 后, 按 5% 的接种量转接菌液至无菌培养基中继代培养, 分别命名为 C-MRS 和 HT 处理, 每个处理重复 3 次。培养 20 代后, 留下具有 pH 下降迅速, 乳酸比例高且相对稳定特征的培养体系, 获取菌种组成稳定的培养物。C-MRS 体系培养下的复合菌系命名为 MLA 1, HT 体系培养下的复合菌系命名为 HLA 1。

1.2.2 复合菌系接种效果验证

为探究筛选出的 2 种菌系接种效果, 以废弃的水果为原料, 将其切成 1~2 cm 小段, 填装至 500 mL 螺口瓶, 分别接种 1 mL 的 MLA 1 和 HLA 1 复合菌系进行酵素发酵, 2 个发酵处理分别为 M 和 H, 35 °C 发酵 15 d, 以不接种复合菌系的处理作对照(CK), 每个处理设 3 个重复。分别取第 0、1、2、3、4、5、10、15 d 的酵素液各 2 mL 置于 5 mL 离心管中, -20 °C 保存, 用于后续测定。

1.2.3 不同处理酵素的抑菌作用

分别按照 5% (V:V) 的添加量加入 M、H 和 CK 的酵素液于灭菌后的 PDA 液体培养基中, 培养 15 d 后接种尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 再培养 7 d, 以不添加酵素只接种尖孢镰刀菌的培养处理做空白对照(B)。采用倒平板法放于 25 °C 培养箱中静置培养, 每个处理设 3 组重复。培养第 7 天时, 利用游标卡尺分别测量每个处理的病原菌生长直径。用以下公式计算出抑制率^[18]:

$$\eta = (D_{ck} - D_i) / D_i$$

式中: η 为抑菌率, %; D_{ck} 为对照抑菌圈直径, mm; D_i 为处理抑菌圈直径, mm。

1.2.4 理化性质分析

放入离心机以 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用来测定 pH、挥发性脂肪酸的含量, 沉淀的 pH 测定使用瑞士 Mettler Toledo 公司的 pH/Mv 台式微

量 pH 计。采用高效液相色谱法(HPLC)进行 VFA 测定, 所用仪器为 HPLC 仪(日本, Shimadzu, LC-20A)。按照 Cai 等^[19]的方法测定。

1.2.5 高通量测序和 Q-PCR 荧光定量

该部分由上海派森诺生物有限公司完成, 通过高通量测序测定农用酵素复合菌系第 20 代的微生物多样性。通过 Q-PCR 荧光定量检测相关数据和相应的标准曲线, 计算出样品中细菌和乳酸菌 16S rRNA 基因拷贝数, 个/ μ L; 每个样品重复 2 次。

1.3 统计分析

基础数据处理和显著性差异分析使用 Excel 2013 和 IBM SPSS v 19.0 软件。高通量测序图谱采用派森诺云平台(中国, 上海)数据分析软件分析。

2 结果与分析

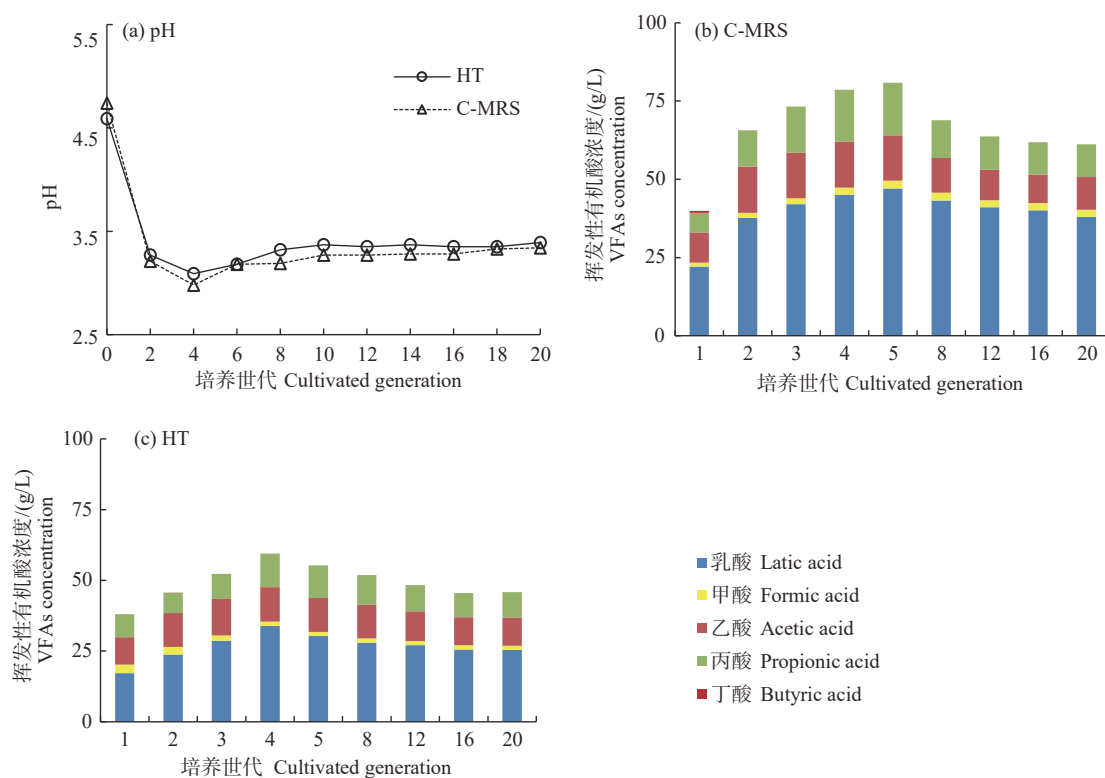
2.1 乳酸菌复合菌系 MLA 1 和 HLA 1 的筛选

由图 1 可知, 在 35 °C 筛选过程中, C-MRS 和 HT 培养基的 pH 均在第二代迅速下降, 第 4 代达到最低值, 发酵至第 10 世代时 pH 趋于稳定, 至 20 世代, C-MRS 和 HT 培养体系的 pH 分别为 3.34 和 3.39。HT 终世代的 pH 均低于 C-MRS ($P > 0.05$), C-MRS 体系中乳酸、乙酸、挥发性有机酸(VFAs) 浓度分别为 37.9、10.4、64.1 g/L, HT 中乳酸、乙酸、VFAs 浓度分别是 25.4、9.9、45.8 g/L。相比之下, C-MRS 的乳酸和 VFAs 浓度更高 ($P < 0.05$)。所以, C-MRS 在 35 °C 筛选条件下表现出更高的乳酸和挥发性有机酸产量, 且其 pH 稳定性优于 HT。

由图 2 和图 3 可知, 复合菌系 HLA 1 的 Chao、Faith 和 Shannon 均显著高于复合菌系 MLA 1 ($P < 0.05$); HLA 1 含 1 449 个特有 ASV/OTU, MLA 1 含 496 种特有 ASV/OTU, HLA 1 的 ASV/OTU 显著高于 MLA 1 ($P < 0.05$) (图 3(a))。HLA 1 主要为乳酸菌 (*Lactobacillus*) (丰度约 81.52%)、醋酸杆菌 (*Acetobacter*) (约 13.1%) 和葡萄糖杆菌 (*Gluconobacte*) (约 2.71%); MLA 1 中主要为 86.27% 的 *Lactobacillus* 和 13.55% 的 *Acetobacter* (图 3(b))。

2.2 接种复合菌系对农用酵素发酵前期的 pH、有机酸及微生物动态变化的影响

由图 4 可知, 接种 HLA 1 的培养体系(H)和接种 MLA 1 的培养体系(M) 2 个培养体系的初始 pH 低于自然发酵体系(CK), H、M 和 CK 的 pH 均在 3 d

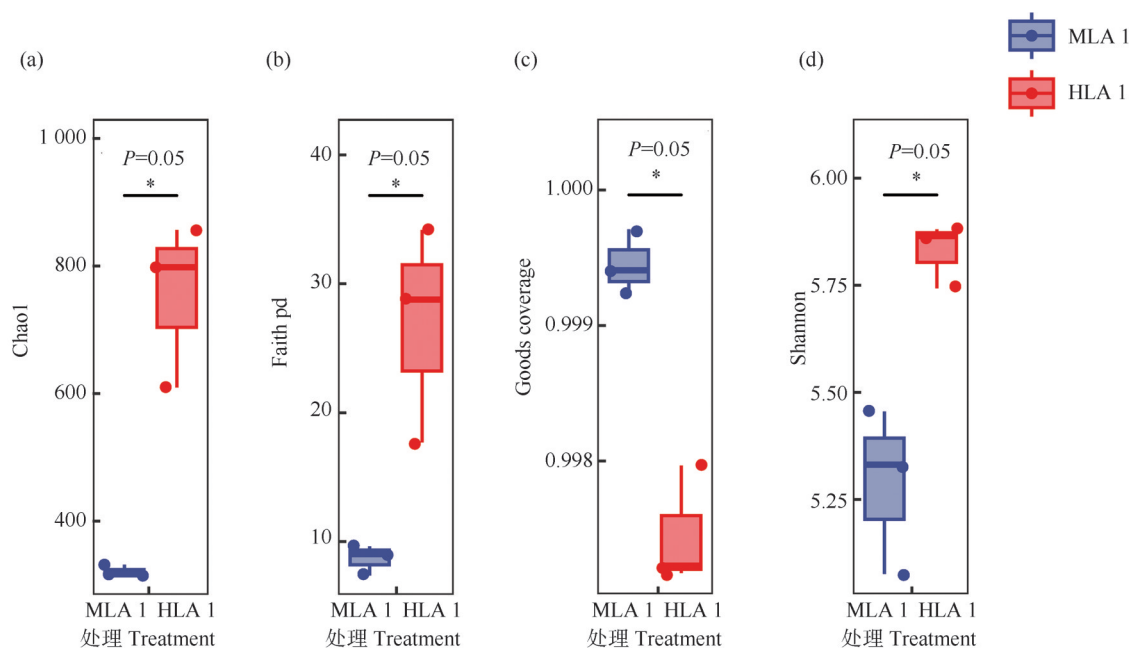


C-MRS 和 HT 分别为用改良 MRS 和红糖培养基。下同。

C-MRS and HT were MRS and brown sugar medium, respectively. The same below.

图1 不同培养条件的复合菌系的 pH 和挥发性脂肪酸的变化

Fig. 1 Dynamic changes of pH and volatile fatty acids of bacteria composite strains under different culture condition



MLA 1 和 HLA 1 分别为 C-MRS 和 HT 培养基所培养的复合菌系。下同。

MLA 1 and HLA 1 are strains cultured by C-MRS and HT, respectively. The same below.

图2 2种复合菌系中微生物的 Chao(a)、Faith(b)、Goods coverage(c)和 Shannon(d)

Fig. 2 Chao (a), Faith (b), Goods coverage (c) and Shannon (d) of microbial community in the two composite strains

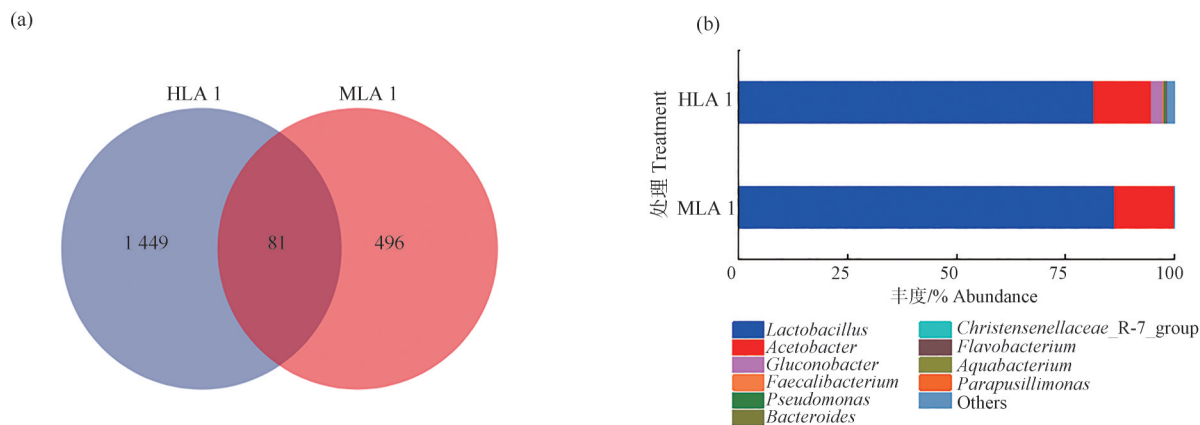
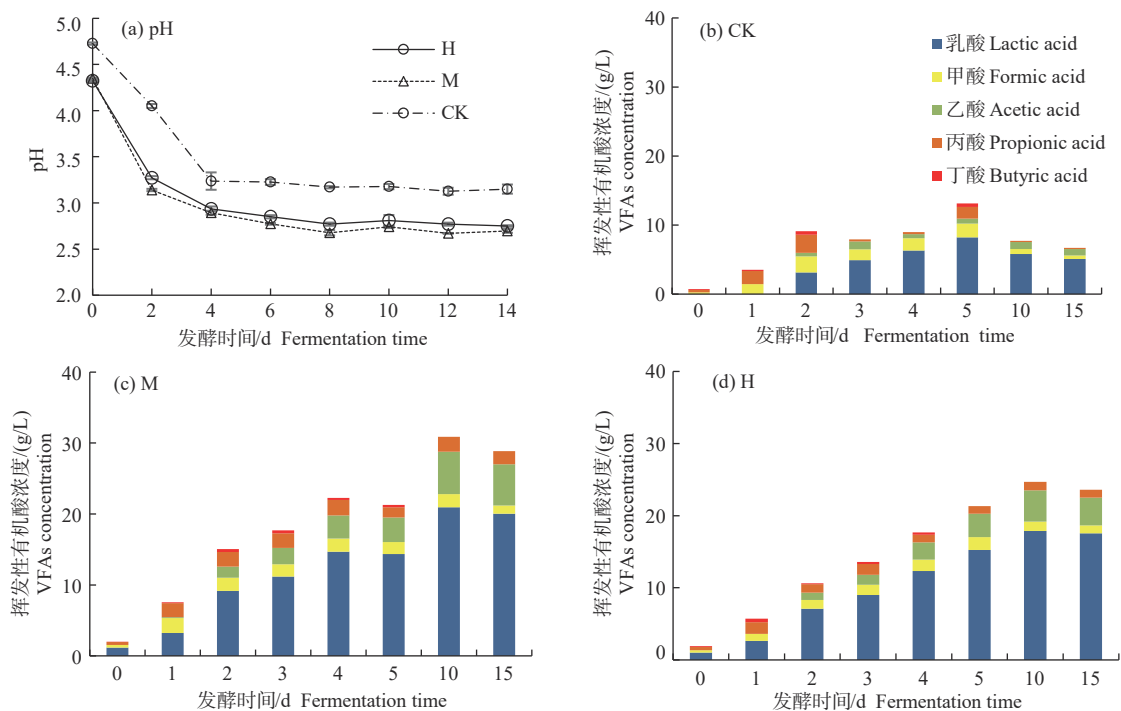


图3 两种复合菌系的韦恩图(a)和微生物群落结构(b)

Fig. 3 The Veen diagram (a) and microbial community structure(b) of two composite strains



M,H分别为接种 MLA 1和HLA 1的发酵处理;CK,不接种复合菌系自然发酵的发酵处理。下同。
M,H were fermentation treatment inoculated MLA 1 and HLA 1, respectively. CK,natural fermentation treatment without MLA 1 and HLA 1. The same below.

图4 不同接种条件农用酵素发酵过程pH和挥发性脂肪酸的变化

Fig. 4 Changes of pH and VFAs during agricultural Jiaosu fermentation under different inoculation conditions

内迅速下降。第4天,CK和H、M的pH分别在3.2、2.9、2.8动态稳定,CK的pH显著低于H和M($P<0.05$)。M的pH略低于H。在发酵的第1天,各处理中乳酸、乙酸、甲酸含量相当,随后乳酸成为主要的VFA,乙酸次之,而随着发酵时间的增加,丁

酸逐渐消失。CK组在第2天开始大量产生乳酸,而M和H均在第1天即开始迅速产乳酸,且产乳酸速率均显著高于CK。CK在第5天VFAs含量达到峰值,之后呈下降趋势,而M和H均在第10天达到峰值后维持稳定,第15天时CK、H和M的乳酸含量分

别为 5.08、17.88、20.06 g/L,CK 的乳酸含量和在 VFAs 中的占比均低于 H 和 M($P<0.05$),而 H 和 M 之间无显著差异。总之,接种 HLA 1 和 MLA 1 的培养体系相比自然发酵体系,pH 下降更快,乳酸产生速率更高,且在发酵过程中维持了较高的 VFAs 含量。

由图 5 可知,细菌和乳酸菌的含量均先升高后

降低。发酵前 5 d,CK、H、M 酵素中细菌 16S rRNA 基因的拷贝数快速上升,均在第 3 天达到最高,拷贝数分别为 5.48×10^6 、 3.53×10^6 、 2.07×10^6 个/ μL 。细菌和乳酸菌 16S rRNA 拷贝数均先上升后下降,最后拷贝数维持在 $10^5\sim10^6$ 个/ μL 。第 15 天时,CK、H、M 酵素中的乳酸菌 16S rRNA 的拷贝数分别约占细菌总量的 14%、30%、26%。

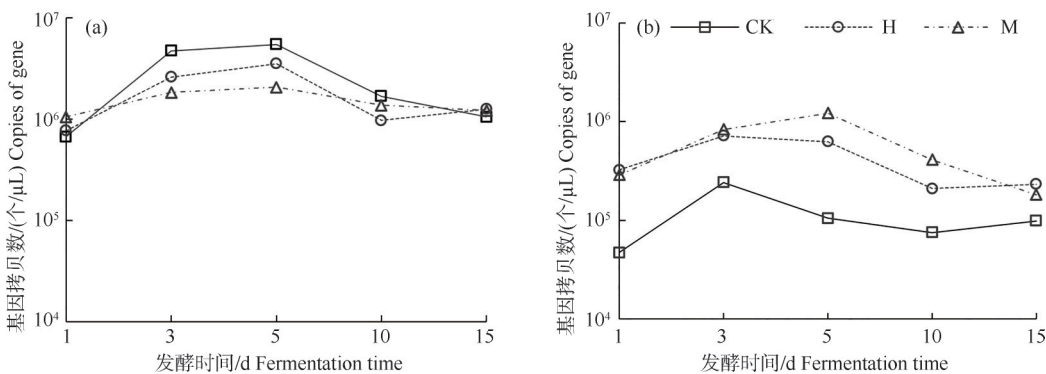


图 5 不同处理的酵素发酵前期的细菌(a)和乳酸菌(b)的 16S rRNA 基因拷贝数

Fig. 5 Gene copies of 16S rRNA of bacteria (a) and lactic acid bacteria (b) in the early stage of Jiaosu fermentation with different treatments

2.3 不同处理的农用酵素对尖孢镰刀菌的抑制效果

由表 1 可知,在 7 d 的抑菌试验中,不同处理的

农用酵素对尖孢镰刀菌均有抑菌效果。M 和 H 的抑菌率分别为 46.8% 和 45.8% 即 M、H 的抑菌率比 CK 高出 15% 以上($P<0.05$)。

表 1 不同处理农用酵素的尖孢镰刀菌的抑菌率(η)

Table 1 Antibacterial rate (η) of *Fusarium Oxysporum* treated with different agricultural Jiaosu

参数 Parameter	CK	H	M
$\eta/\%$	$45.8\pm0.3\text{ b}$	$46.8\pm0.3\text{ c}$	$39.1\pm0.5\text{ a}$

3 讨 论

为使复合菌系能在酵素规模化生产中得到应用,需要找到扩繁成本低的复合菌系,且需要有较好的产酸效果^[4]。C-MRS 和 HT 处理的第 10 代生长过程中的 pH 和 VFAs 变化趋势一致,说明 2 种菌系有类似的主要代谢途径。2 种培养体系下的 pH 差异不显著,而 C-MRS 处理的乳酸和总 VFAs 更多,说明 C-MRS 筛选的菌系产酸能力高于 HT。C-MRS 与 HT 培养基的不同在于 C-MRS 添加了有助于乳酸菌快速繁殖的 MRS 肉汤,HT 的碳源仅为蔗

糖,可能是由 C-MRS 提供了更全面的养分,有助于乳酸菌的富集。而微生物的 α 多样性结果也验证了这一点(图 2),MLA 1 和 HLA 1 的 coverage 指数覆盖率均 $>99.7\%$,可以准确反映样本中细菌的真实情况。MLA 1 和 HLA 1 均以乳酸菌(*Lactobacillus*)和醋酸菌(*Acetobacter*)为优势菌,而 MLA 1 的这 2 个属的丰度更高,专一性更强,在产酸速率和对酸的耐受上更具优势^[20];而 HLA 1 的微生物丰富度、均匀度和多样性更高,对环境的适应能力可能更强^[21]。

农用酵素发酵前期 pH 的迅速降低是决定发酵

质量的重要因素^[11]。所有发酵体系的pH均随着发酵时间的增加逐渐降低直至动态稳定,而MLA 1和HLA 1的pH下降速率高于CK,这可能是由于接种菌剂能帮助乳酸菌等占据优势地位,从而产酸速率更高pH降低更快,缩短了发酵时间;因此,HLA 1和MLA 1均具有快速降低发酵液pH的能力,但2种复合菌系差异较小。乳酸对于降低发酵液pH和抑制有害病菌等均有促进作用,是衡量酵素发酵品质的关键指标^[10]。3种处理的第1天的乳酸比例均较低,从第1天以后快速产生乳酸,这可能是由第1天发酵体系中残余空气,而乳酸菌在有氧环境下难以占据优势^[10],随着氧气被消耗,乳酸代谢途径占据主导,乳酸成为主要的VFA。而MLA 1和HLA 1的乳酸绝对浓度和在VFA中的浓度占比均高于CK,这说明MLA 1和HLA 1的接种强化了酵素发酵中的乳酸代谢途径。在微生物上,CK的细菌16S rRNA基因拷贝数与MLA 1和HLA 1相当,但乳酸菌16S rRNA拷贝数一直低于MLA 1和HLA 1,这说明接种有助于乳酸菌在酵素发酵体系中占据主导地位。而乳酸菌、乳酸和乙酸都是重要的抑菌成分^[22],最终MLA 1和HLA 1的这些成分含量均比CK更高,这也解释了H和M具有更高的抑菌率。虽然MLA 1的接种效果仍略优于HLA 1,但C-MRS所需的MRS培养基成本更高,相比之下HT所需的红糖廉价且易获取,二者成本相差数十倍。因此综合考虑成本和使用效果,HT在生产中更适合作为筛选酵素复合菌系的限制性培养基在生产中应用。

在限制性继代培养中,与HLA 1相比,MLA 1的乳酸菌丰度更高,也表现出更强的乳酸分泌能力和耐酸性,但在接种到农用酵素发酵体系中,二者的差距有所缩小。这可能是由于C-MRS培养基含有更全面的营养,维持了部分产酸能力强但环境适应力差的乳酸菌类群,这些类群在接种后由于不能适应复杂的环境而难以定植^[17],降低了MLA 1的接种效果。因此,工程菌系的筛选中,也需要考虑复合菌系能否在更复杂的环境中保持高效。而目前在发酵接种菌剂的研究中,还是以单一或组配菌占多数,在实际生产的复杂环境中发挥的作用较为有限。而从环境中分离具有特定功能或适应力的菌系往往有

助于改善类似环境下的微生物群落^[23]。在筛选复合菌系过程中创造与应用场景更相似的环境,有助于提高复合菌系的抗逆性和接种后的产酸能力^[24-26],这类培养基的原料成本也往往更低。微生物群落组成往往因环境的不同存在差异^[27]。因此,在复合菌系的筛选中,基于应用环境优化培养基的成分是一个有助于降低菌剂成本提高抗逆性的思路。

4 结 论

本研究以发酵优良的农用酵素作为原料,利用改良MRS(C-MRS)和红糖(HT)培养基对其进行限制性继代培养,筛选出2组产酸能力强、组成稳定的乳酸菌复合菌系MLA 1和HLA 1。其中,MLA 1的乳酸菌丰度比HLA 1高4.7%,在培养过程中展现出了更强的产酸和耐酸能力。2种复合菌系的接种均使酵素发酵过程的乳酸产量增加250%以上,乳酸菌在细菌中的占比达到25%以上,对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑菌率升高15%以上。此外,接种本研究筛选出的乳酸菌复合菌系能显著提升酵素发酵过程中乳酸菌拷贝数及乳酸和乙酸产量($P < 0.05$),从而提升酵素的抑菌效果。综上,MLA 1和HLA 1的接种均能提高酵素中的乳酸和乳酸菌的含量和酵素对*Fusarium oxysporum*的抑菌率,考虑到原料成本,红糖培养基更具有实用价值,HLA 1在生产中更容易获取,且接种效果与MLA 1接近,因而更具推广潜力。

参考文献 References

- [1] 中华人民共和国农业农村部. 国家农业综合开发办公室. 农业综合开发区域生态循环农业项目指引(2017—2020年)[EB/OL]. (2016-09-28). <http://ishare.iask.sina.com.cn/f/bw36V5kg1ad.html>
Ministry of Agriculture and Rural Development of the People's Republic of China. National Office of Comprehensive Agricultural Development. Guidelines for comprehensive agricultural development regional ecological recycling agricultural projects (2017-2020) [EB/OL]. (2016-09-28). [http://ishare.iask.sina.com.cn/f/bw36V5kg1ad.html\(in Chinese\)](http://ishare.iask.sina.com.cn/f/bw36V5kg1ad.html(in Chinese))
- [2] 中华人民共和国农业农村部. 到2020年化肥施用量零增长行动方案[EB/OL]. (2019-04-18). <http://wenku.baidu.com/view/c893484eef06eff9aef8941ea76e58fafab0459f.html>
Ministry of Agriculture and Rural Development of the People's Republic of China. Zero-growth action plan for fertilizer application by 2020 [EB/OL]. (2019-04-18). [http://wenku.baidu.com/view/c893484eef06eff9aef8941ea76e58fafab0459f.html\(in Chinese\)](http://wenku.baidu.com/view/c893484eef06eff9aef8941ea76e58fafab0459f.html(in Chinese))

- [3] 中华人民共和国农业农村部. 到2020年农药使用量零增长行动方案[EB/OL]. (2015-02-17). <http://wenku.baidu.com/view/c3398d36b94ae45c3b3567ec102de2bd9605ded6.html>
Ministry of Agriculture and Rural Development of the People's Republic of China. Zero-growth action program for pesticide use by 2020 [EB/OL]. (2015-02-17), <http://wenku.baidu.com/view/c3398d36b94ae45c3b3567ec102de2bd9605ded6.html> (in Chinese)
- [4] 王小芬, 高丽娟, 杨洪岩, 李献梅, 高秀芝, 崔宗均. 苜蓿青贮过程中乳酸菌复合系A12的接种效果及菌群的追踪[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 217-222
Wang X F, Gao L J, Yang H Y, Li X M, Gao X Z, Cui Z J. Effect of inoculating lactic bacteria community A12 and microbial shifts during alfalfa ensiling process [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23(1): 217-222 (in Chinese)
- [5] 杨洪岩, 袁旭峰, 刘小平, 王小芬, 崔宗均. 水稻秸秆低温复合菌系多样性及发酵动态[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1248-1255
Yang H Y, Yuan X F, Liu X P, Wang X F, Cui Z J. Microbial diversity of a community for ensiling rice straw at low temperature and fermentation dynamics [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1248-1255 (in Chinese)
- [6] Xu S L, Gu X H, Wu Q, Gao Y H, Cai Y F, Ma S S, Zheng Z H, Wang X F. An ecological and economic approach to enhancing the agronomic quality of anaerobic digestate: Effects of adding agricultural Jiaosu on metabolism and the microbial community [J/OL]. *Chemical Engineering Journal*, (2023-07-15). DOI: doi.org/10.1016/j.cej.2023.143648
- [7] Zhao X L, Liu J H, Liu J J, Yang F Y, Zhu W B, Yuan X F, Hu Y G, Cui Z J, Wang X F. Effect of ensiling and silage additives on biogas production and microbial community dynamics during anaerobic digestion of switchgrass [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 349-359
- [8] 马倩颖. 浅析环保酵素在家居和农业上的应用[J]. 科技风, 2018(5): 150
Ma Q Y. Brief analysis the application of environmental protection enzymes to home and agriculture [J]. *Technology Wind*, 2018(5): 150 (in Chinese)
- [9] 欧阳传德, 陈琴琴. 浅议自制环保酵素在农业生产中的应用[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(23): 53-54
Ouyang C D, Chen Q Q. Discussion on the application of self-made environmental protection enzyme in agricultural production [J]. *Anhui Agricultural Bulletin*, 2017, 23(23): 53-54 (in Chinese)
- [10] Zhang Y, Gao Y H, Zheng Z H, Meng X Y, Cai Y F, Liu J B, Hu Y G, Yan S D, Wang X F. A microbial ecosystem: Agricultural Jiaosu achieves effective and lasting antifungal activity against *Botrytis cinerea* [J/OL]. *AMB Express*, (2020-12-14). DOI: doi.org/10.1186/s13568-020-01156-7
- [11] Gao Y H, Zhang Y, Cheng X Q, Zheng Z H, Wu X H, Dong X H, Hu Y G, Wang X F. Agricultural Jiaosu: An eco-friendly and cost-effective control strategy for suppressing *Fusarium* root rot disease in *Astragalus membranaceus* [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, (2020-12-14). DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2022.82370
- [12] Cui Y H, Hu T, Qu X J, Zhang L W, Ding Z Q, Dong A J. Plasmids from food lactic acid bacteria: Diversity, similarity, and new developments [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 13172-13202
- [13] Garlotta D. A literature review of poly (lactic acid) [J/OL]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2001, 9(2): 63-84
- [14] 王建, 罗红霞, 于佳弘, 汪长钢, 张俊. 响应面法优化复合乳酸菌培养条件[J]. 中国酿造, 2016, 35(2): 66-69
Wang J, Luo H X, Yu J H, Wang C G, Zhang J. Optimization of culture conditions for compound lactic acid bacteria by response surface methodology [J]. *China Brewing*, 2016, 35(2): 66-69 (in Chinese)
- [15] 王德光. 饲用菌种(株)的分离鉴定及复合菌剂降解玉米皮—统糠粗纤维的效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017
Wang D G. Isolation and identification of feeding strains and the effect of compound bacteria on degradation of corn bran chitosan [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017 (in Chinese)
- [16] 穆永其, 阿曼尼萨·阿木提, 曾红, 陈伟. 不同培养基对放线菌 TRM10325 抑制群感效应活性的影响[J]. 生物资源, 2019, 41(1): 35-43
Mu Y Q, Amanisa A, Zeng H, Chen W. Effects of different media on the inhibition of quorum sensing activity by actinomycete TRM10325 [J]. *Biotic Resources*, 2019, 41(1): 35-43 (in Chinese)
- [17] 王灿, 胡洪营, 于茵, 文湘华. 培养基种类和培养条件对白腐真菌生长和产酶特性的影响[J]. 环境科学研究, 2007, 20(2): 9-13
Wang C, Hu H Y, Yu Y, Wen X H. Influence of culturing mediums and conditions on characterization of growth and enzyme production of white rot fungi [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(2): 9-13 (in Chinese)
- [18] Kuwaki S, Ohhira I, Takahata M, Murata Y, Tada M. Antifungal activity of the fermentation product of herbs by lactic acid bacteria against tinea [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94(5): 401-405
- [19] Cai Y F, Hu K, Zheng Z H, Zhang Y, Guo S Y, Zhao X L, Cui Z J, Wang X F. Effects of adding EDTA and Fe^{2+} on the performance of reactor and microbial community structure in two simulated phases of anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 275: 183-191
- [20] Keshri J, Chen Y, Pinto R, Kroupitski Y, Weinberg Z G, Sela S. Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum* inoculant [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(9): 4025-4037
- [21] Qiao C C, Penton C R, Liu C, Tao C Y, Deng X H, Ou Y N, Liu H J, Li R. Patterns of fungal community succession triggered by C/N ratios during composting [J/OL]. *Journal of Hazardous Materials*, (2021-01-05). DOI: doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123344
- [22] Yan J, Sun Y B, Kang Y H, Meng X Y, Zhang H, Cai Y F, Zhu W B, Yuan X F, Cui Z J. An innovative strategy to enhance the ensiling quality and methane production of excessively wilted wheat straw: Using acetic acid or hetero-fermentative lactic acid bacterial community as additives [J/OL]. *Waste Management*, 2022, 149: 11-20
- [23] Huet S, Romdhane S, Breuil M-C, Bru D, Mounier A, Spor A, Philippot L. Experimental community coalescence sheds light on microbial interactions in soil and restores impaired functions [J/OL]. *Microbiome*, (2022-06-01). DOI: doi.org/10.1186/s40168-023-01480-7
- [24] Ulrich A, Klimke G, Wirth S. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application [J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 512-522
- [25] Xiao J W, Xu F Y, Hui W, Li J J, Xiao F W, Zong J C. Characteristics and community diversity of a wheat straw-colonizing microbial community [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(40): 7853-7861
- [26] Yang H Y, Wu H, Wang X F, Cui Z J, Li Y H. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3546-3550

[27] 范鹤龄, 朱清, 孙雪冰, 张丽, 李长江, 陈萍, 黄小龙, 张荣萍. 不同农用
酵素的微生物多样性和群落结构[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24, (11)
179-189
Fan H L, Zhu Q, Sun X B, Zhang L, Li C J, Chen P, Huang X L,

Zhang R P. Microbial diversity and community structure of different
agricultural Jiaosu[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*,
2022, 24 (11): 179-189 (in Chinese)
责任编辑: 吕晓梅



第一作者简介: 许书林, 中国农业大学农学院 2021 级博士研究生。主持地市级科研项目 2 项, 获得实
用新型专利 1 项。以第一作者在 SCI 收录期刊发表论文 2 篇。



通讯作者简介: 王小芬, 博士, 中国农业大学农学院教授, 博导, 研究方向为作物秸秆和畜禽粪便资源
化, 中国生物发酵协会酵素分会理事, 山东高密市、山西怀仁市等地畜禽粪便整县推进首席科学家。
参与科技部国家“十三五”重点研发项目(2019YFC0408700)和国家“十四五”重点研发项目
(2021YFD1901103-1), 担任子课题项目负责人。曾获中国城市环境卫生协会科学技术奖, 中国城市
环境卫生协会科技进步国家一等奖, 全国农业专业学位研究生教育指导委员会实践教学成果奖, 全
国农业专业学位研究生教育指导委员会其他国家一等奖。发表 SCI 论文 40 余篇, 参与编写《农业
原理》。