

整合微生物组菌剂的提出、研发与应用

刘波¹, 陈倩倩¹, 王阶平¹, 阮传清¹, 陈燕萍¹, 夏江平², 车建美¹, 陈峥¹, 潘志针¹,
文笑², 朱育菁¹, 张海峰¹, 郑雪芳¹

(¹福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; ²厦门江平生物基质技术股份有限公司, 福建厦门 361009)

摘要:【目的】利用微生物发酵床作为发酵槽, 猪粪氮素连续流加中温好氧发酵, 将通过宏基因检测鉴定到的微生物组称为整合微生物组, 生产高含菌量整合微生物组菌剂, 作为植物病害生防菌剂。【方法】生产工艺: 原料配制→发酵床发酵→猪粪氮素连续流加→好氧发酵控制→产品加工→产品包装等。生产技术: 利用养猪使用 1 年以上的微生物发酵床, 添加一层 10 cm 厚的 30%豆饼粉+70%杏鲍菇菌糠垫料, 每平方米 1 头猪作为猪粪氮素连续流加营养来源, 每天翻耕 1 次, 连续好氧发酵 20 d 后, 取出上层 20 cm 的垫料, 进入晾晒、粉碎、分筛、包装, 加工成整合微生物组菌剂。【结果】整合微生物组菌剂产品技术指标: 含水量 29.74%, pH 7.56, 有机质含量 44.46%, 全氮含量 2.23%, 腐殖酸含量 11.20%, 粗纤维含量 14.06%, 含菌量 145×10^8 cfu/g。宏基因组测定结果表明, 菌剂样品序列 (reads) 条数平均值为 99 701.75, 每克菌剂含有细菌 39 门、96 纲、189 目、383 科、786 属、1 281 种; 其中, 芽孢杆菌 46 种, 9 种为中国新记录种, 即: ①嗜气芽孢杆菌 (*Bacillus aerophilus*)、②蚯蚓芽孢杆菌 (*Bacillus eiseniae*)、③丝状芽孢杆菌 (*Bacillus filamentosus*)、④柯赫芽孢杆菌 (*Bacillus kochii*)、⑤根际芽孢杆菌 (*Bacillus rhizosphaerae*)、⑥长型赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus macroides*)、⑦淤泥大洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus caeni*)、⑧拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌 (*Ornithinibacillus scapharcae*)、⑨海洋枝芽孢杆菌 (*Virgibacillus oceani*); 未发现猪细菌病原。可培养法分离的芽孢杆菌活菌数 2.062×10^8 cfu/g, 宏基因组测定结果中, 芽孢杆菌的总丰度为 1.42%, 以此推算菌剂有效细菌总含量 145×10^8 cfu/g。整合微生物组菌剂浸出液处理组的绿豆发芽率为 96.67%, 与清水对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 但胚根长比对照增加了 58.08%。用 5%—10%的菌剂配制成育苗基质, 番茄出苗率提高了 3.0%, 株高增加了 25.1%, 对番茄青枯病的校正防治效果可达 79.41%。整合微生物组菌剂的产品质量标准参考农业农村部生物有机肥标准 (NY884-2012), 初步确定为: 有机质 $\geq 40\%$, 含水量 $\leq 30\%$, pH 5.5—7.5, 粪大肠菌群数 ≤ 100 个/g, 蛔虫卵死亡率 $> 95\%$, 有效期 > 6 个月; 重金属含量满足标准要求: 砷 ≤ 15 mg·kg⁻¹, 镉 ≤ 15 mg·kg⁻¹, 铅 ≤ 15 mg·kg⁻¹, 铬 ≤ 15 mg·kg⁻¹, 汞 ≤ 15 mg·kg⁻¹; 有效活菌数调整为: 总细菌数 $\geq 30 \times 10^8$ cfu/g, 其中芽孢杆菌 $\geq 2 \times 10^8$ cfu/g。【结论】提出了整合微生物组菌剂的概念和产品技术标准。研发的整合微生物菌剂可促进种子根部生长, 并对番茄青枯病有良好的防治效果。

关键词: 整合微生物组菌剂; 生物有机肥; 绿豆; 发芽率; 胚根长; 生长率; 青枯病; 防治效果

Proposition, Development and Application of the Integrated Microbiome Agent (IMA)

LIU Bo¹, CHEN QianQian¹, WANG JiePing¹, RUAN ChuanQing¹, CHEN YanPing¹, XIA JiangPing²,
CHE JianMei¹, CHEN Zheng¹, PAN ZhiZhen¹, WEN Xiao², ZHU YuJing¹,
ZHANG HaiFeng¹, ZHENG XueFang¹

(¹Agricultural Bioresources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003; ²Xiamen Jiangping Biology Substrate Technology Co. Ltd., Xiamen 361009, Fujian)

收稿日期: 2019-03-19; 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0500201)、福建省公益类科研院所专项 (2018R1017-1)、福建省公益性项目 (2016R1017-2)、福建省自然科学基金 (2018J01036)

联系方式: 刘波 (通信作者), E-mail: fzliubo@163.com

Abstract: 【Objective】 Using microbial fermentation bed as fermentation tank, pig manure nitrogen was continuously added to achieve aerobic fermentation in medium temperature. Microbiome with high bacterial content identified by metagenomic technology was named as integrated microbiome. Integrated microbiome agent (IMA) was produced as plant disease biocontrol agent. **【Method】** The production process is as follows: material preparation→fermentation→nitrogen feeding→aerobic fermentation control→product processing→product packaging, etc. The fully manufacturing processes of IMAs were as follows: the litters consisting of soybean cake powders (30%) and *Pleurotus eryngii* mushroom substrates (70%) were added onto the pig microbial fermentation bed that had been used for more than one year with 10 cm thick; the aerobic fermentation was conducted for 20 days by ploughing the litters mixing with pig manures one time per day; then, the upper 20 cm litters were removed to produce IMAs by drying, crushing, screening and packaging. **【Result】** The physicochemical properties of the IMA products were moisture content 29.74%, pH 7.56, organic matter content 44.46%, total nitrogen content 2.23%, humic acid content 11.20%, crude fiber content 14.06%, and the amount of bacteria was 145×10^8 cfu/g. The results of metagenomic determination showed that the average number of the short sequences (reads) was 99 701.75 in the IMA samples, and the IMA samples contained 39 phyla, 96 classes, 189 orders, 383 families, 786 genera, and 1 281 species of bacteria per gram. Among bacteria, 46 *Bacillus*-like species were detected, and 9 species were the new records in China, namely: (1) *Bacillus aerophilus*, (2) *Bacillus eiseniae*, (3) *Bacillus filamentosus*, (4) *Bacillus kochii*, (5) *Bacillus rhizosphaerae*, (6) *Lysinibacillus macroides*, (7) *Oceanobacillus caeni*, (8) *Ornithinibacillus scapharcae*, (9) *Virgibacillus oceani*. Importantly, no bacterial pathogen of pig was found in the IMA products. The total content of the cultural *Bacillus*-like species was 2.062×10^8 cfu/g, and they accounted for 1.42% of total bacterial abundance in the metagenomic data. Therefore, the total amount of effective bacteria was estimated to be 145×10^8 cfu/g in the IMA products based on the cultural *Bacillus*-like species content and total abundance of metagenomic detecting. The germination rate of mung bean in the IMA group was 96.67%, which was not significantly different from that in the clear water control group ($P > 0.05$), but the radicle length was 58.08% higher than that in the control group. When the seedling-raising substrate was mixed with 5%-10% of IMAs, the emergence rate and plant height of tomato were increased by 3.0% and 25.1%, respectively, and the corrected control efficacy on tomato bacterial wilt was 79.41%. According to the national quality standards for the bio-organic fertilizers (NY884-2012), those of the IMA products were initially set as followings: organic matter content $\geq 40\%$, moisture content $\leq 30\%$, pH 5.5-7.5, fecal coliform count ≤ 100 cfu/g, mortality of ascarid egg $> 95\%$, expiry date > 6 months; The contents of heavy metals: As ≤ 15 mg·kg⁻¹, Cd ≤ 15 mg·kg⁻¹, Pb ≤ 15 mg·kg⁻¹, Cr ≤ 15 mg·kg⁻¹, and Hg ≤ 15 mg·kg⁻¹; The amount of living bacteria was adjusted to the total living bacteria amount $\geq 30 \times 10^8$ cfu/g, *Bacillus*-like species amount $\geq 2 \times 10^8$ cfu/g. **【Conclusion】** The concept and product technical standard of the integrated microbiome agents (IMAs) were proposed. The IMA can promote the growth of seed root and have a good control efficacy on tomato bacterial wilt.

Key words: integrated microbiome agent (IMA); bio-organic fertilizer; mung bean; germination rate; radicle length; growth rate; bacterial wilt; control efficacy

0 引言

【研究意义】随着现代农业产业结构调整,作物的专业化、区域化和规模化栽培面积不断增加,但耕地资源有限,使得连作和复种指数不断增加,日益严重的作物连作障碍(continuous cropping obstacle)已成为限制农业生产可持续发展的瓶颈之一。连作障碍发生区域广、涉及的作物种类多,轻则导致减产减收,重则绝收,造成严重的经济损失。国内外学者对作物连作障碍的研究较多,如三七^[1]、番茄^[2-3]、人参^[4]、棉花^[5]、地黄^[6-8]、黄瓜^[9]、甜瓜^[10]、西瓜^[11]、马铃薯^[12]、当归^[13]、大豆^[14]、黄连^[15]等。相关研究普遍认为,导致作物发生连作障碍的主要因素包括:(1)根际正常微生物组结构失衡,病原微生物增加,有益微生物减少^[5];(2)土壤理化性状的恶变,导致酸化、

盐渍化和肥力下降,为病原真菌滋长提供了有利的条件,可加重土传病害的发生^[2-3];(3)植物根系自毒物质引起根系微生物组异常,弱化了根系微生物组对病害的抑制,抑制了土壤解磷解钾固氮微生物,引起植物营养缺陷^[9,16]。目前解决连作障碍措施主要有轮作和间作^[2]、抗病品种筛选^[10]、土壤消毒^[17]、增施有机肥增加微生物组实施生物防治等^[5]。以养殖废弃物和农业副产物为原料,生产整合微生物组菌剂(integrated microbiome agent, IMA),调控作物根际微生物,对连作障碍生物防控和畜禽粪便资源化利用具有重要意义。**【前人研究进展】**作物连作过程农事操作与土壤微生物群落变化关系密切。人参、棉花、马铃薯和大豆等连作过程中的土壤微生物群落变化已有较为深入的研究^[4-5,12,14]。结果表明土壤微生物平衡的破坏是作物连作障碍的主要因素。整合微生物组

(integrated microbiome)影响着土壤功能。土壤整合微生物是利用宏基因组等方法分析到的微生物组的集合,已有较多研究报道,如 YANG 等^[18]报道了土壤整合微生物群落变化与烟草青枯病的关系;NOVELLO 等^[19]报道了土壤根际整合微生物组与葡萄病虫害综合治理的关系;KALIVAS 等^[20]利用宏基因组揭示了生菜栽培过程土壤整合微生物组替代氮肥的机制。环境因素与整合微生物组存在相互作用,作者提出整合微生物组菌剂的概念,利用宏基因组能检测到菌剂的微生物组的集合称之为整合微生物组,试图通过整合微生物组的干预,改变植物根系环境中的微生物结构,提升微生物在环境中的功能,如元素降解、病害抑制、毒素分解等,用于消除作物连作障碍,相关研究未见报道。【本研究切入点】围绕整合微生物组菌剂(简称整合菌剂)产品生产技术和质量指标、整合菌剂功能比较、整合菌剂对土壤微生物组的影响、整合菌剂对连作障碍防控作用等开展研究,分析作为一种新型制剂提出的整合微生物组菌剂生产和应用的可行性。

【拟解决的关键问题】阐述整合微生物组菌剂的生产过程,研究菌剂的微生物组结构,测定整合微生物组菌剂对作物发芽率、出苗率、病害防控等作用,为连作障碍生物防控、畜禽粪便资源化利用、微生物组菌剂研发与应用提供科学依据。

1 材料与方法

试验于 2018—2019 年在福建省农业科学院完成。

1.1 整合微生物组菌剂的生产过程

整合微生物组菌剂的生产采用微生物发酵床大栏养猪系统进行。地点为福建省农业科学院福清现代设施农业样本工程示范基地,微生物发酵床大栏养猪舍建筑面积为 2 100 m²(长 60 m,宽 35 m),养殖面积为 1 600 m²,发酵床垫料深度 80 cm,发酵床垫料由 33%椰糠、33%锯糠和 34%谷壳组成。发酵床饲养 1 600 头育肥猪,猪粪便排泄在垫料上,垫料管理每天旋耕 1 次,垫料发酵下沉时补充新垫料到原来高度;连续使用 1 年养猪发酵床作为基础,在生产整合微生物菌剂时,利用 30%豆饼粉+70%杏鲍菇菌糠混合成生产原料,平铺在发酵床上 10 cm,发酵床相对湿度控制在 50%—60%,发酵床表面温度约 24—26℃,内层温度 40.5—45.5℃。每天猪排便作为氮素流加,进行二次固体耗氧发酵,每天用拖拉机旋耕 1 次,旋耕深度 20 cm,充分混合发酵床原有垫料、添加垫料、猪粪,相对湿度调整在 55%—65%,连续操作发酵 20 d;

发酵结束进入产品加工,将表层 20 cm 发酵好的垫料收集作为整合微生物菌剂的原料,进行晾晒干燥 5 d,当发酵产物含水量<30%时,经过晾干、粉碎、过筛等加工,检验、包装成为高含菌量的整合微生物组菌剂产品,包装规格为 10 kg/袋。整合微生物组菌剂生产工艺包括了原料配置→发酵床发酵→发酵控制→产品加工→产品包装等过程(图 1、附图 1)。关于整合菌剂生产装备、发酵调控和品管技术将另文报道。

1.2 整合微生物组菌剂营养成分分析

从产品中取样 7 个,记为 g₁, g₂, ... g₇, 送检测资质单位福建省农业科学院土壤肥料研究所分析,测定理化性质和营养成分,包括水分(%)、pH、有机质(%)、全氮(%)、腐殖酸(%)、粗纤维(%)等,统计平均值。

1.3 整合微生物组菌剂芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)活菌总含量的测定

对采集的 7 个样品进行芽孢杆菌活菌分离,采用 MS 培养基,称量 10 g 样品,配制含 10%样品水悬浮液,加热至 80℃维持 20 min,保留芽孢杆菌,消除其他杂菌,通过梯度稀释涂布菌落计数法,标记菌落形态特征,进行菌落归类 and 统计计数;采用通用细菌 16S rRNA 引物进行扩增、测序、比对、鉴定,确定标记菌落为芽孢杆菌后,统计计算每克产品含芽孢杆菌菌落数(cfu/g),每个样品试验重复 3 次,计算平均值。

1.4 基于宏基因组的整合菌剂产品细菌微生物组测定

从整合微生物组菌剂产品中取样 7 个样品,每个称取 100 g 混合均匀后共获得 700 g 样品,从中取 50 g 利用宏基因组进行细菌微生物组分析:(1)总 DNA 的提取:按土壤 DNA 提取试剂盒 FastDNA SPIN Kit for Soil 的操作指南,分别提取各垫料样本的总 DNA,于-80℃冰箱冻存备用;(2)16S rDNA 测序文库的构建:采用扩增原核生物 16S rDNA 的 V3-V4 区的通用引物 U341F 和 U785R 对各垫料样本的总 DNA 进行 PCR 扩增,并连接上测序接头,从而构建各垫料样本的真细菌 16S rDNA V3-V4 区测序文库;(3)高通量测序:使用 Illumina MiSeq 测序平台,采用 PE300 测序策略,每个样本至少获得 10 万条 reads;细菌微生物组测定由上海美吉公司完成。将序列与已知物种的 16S 数据库(Silva, <http://www.arb-silva.de>)比对,进行物种注释,得出物种信息。获得的样品细菌微生物



图 1 整合微生物组菌剂的生产工艺

Fig. 1 Production process of the integrated microbiome agent

组数据后分析：（1）细菌门水平微生物组序列数（reads）；（2）细菌微生物组各分类阶元种类（OTU）数量；（3）前 10 种高含量细菌种类测定；（4）细菌微生物组中芽孢杆菌种类丰度（%）。

1.5 整合微生物组菌剂对种子发芽的影响

将 0.1 kg 的整合微生物组菌剂产品浸泡在 0.4 L 水中，搅拌过夜后，用 4 层纱布过滤，收集滤液，即为 25%的整合微生物组菌剂浸出液。取上述溶液 20 mL，置于直径 9 cm 的培养皿，培养皿底部放置一张滤纸；选饱满、无病虫害的绿豆种子，用浸出液浸种 30 min，每皿中放置 12 颗绿豆种子，重复 5 次，用清水 20 mL 作为对照（CK），将其置于 28℃恒温人工气候箱，光照 16 h：黑暗 8 h。每 24 h（1 d）观察绿豆的发芽数量、胚根长度，统计发芽率、发芽指数和活力指数；以对照组为参照，计算处理组与对照组胚根长度和活力指数的比值，分析整合微生物组菌剂 25%浸出液对绿豆发芽的影响。计算公式：发芽率（G，%）=（发芽种子数/供试种子数）×100。发芽指数（GI）=Σ（Gt/Dt）。其中，Gt 为第 t 天的发芽种子数，Dt 为相应发芽天数。活力指数（VI）=GI×S。其中，GI 为发芽指数，S 为发芽 t 时间内胚根及胚轴的总长度（cm）。

1.6 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗壮苗作用的影响

配制育苗基质，选择整合微生物组菌剂产品与椰糠配制不同体积比例的育苗基质，处理设置高含量组处理 1 和处理 2，整合微生物组菌剂占比分别为 30%、25%；中含量组处理 3 和处理 4，占比分别为 20%、15%；低含量组处理 5 和处理 6，占比分别为 10%、5%；育苗基质配制混合后，平铺于穴盘进行番茄育苗，番茄品种为不抗青枯病的‘农科 180’，每个处理播种 25 粒种子，重复 2 次，用椰糠做育苗基质对照（CK）；放入 30℃温室，以日光灯为光源，光照 16 h：黑暗 8 h，每日定期喷水管理；于 10、20、30 d 定期观察番茄的出苗和生长情况，统计 30 d 的番茄出苗率（%）、根长（cm）、株高（cm）、茎粗（cm）等，比较分析不同处理整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗壮苗作用的影响。

1.7 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗青枯病防控的影响

用以上不同处理组的穴盘育苗 30 d 后的番茄穴盘苗（‘农科 180’）继续进行青枯病防控试验；每个处理灌根接种浓度为 10⁶ cfu/mL 强致病力青枯雷尔氏

菌 (*Ralstonia solanacearum*) FJAT-91 发酵液 200 mL, 对照组浇灌清水为对照; 接种后分别在第 4、7、10 天观察计算番茄苗青枯病发病率, 统计整合微生物组菌剂高含量组 (25%—30%)、中含量组 (15%—20%)、低含量组 (5%—10%)、对照组 (清水) 的平均发病率, 计算 10 d 校正防效, 进行分析比较。校正防效 (%) = [(对照组发病率 - 处理组发病率) / 对照组发病率] × 100。

2 结果

2.1 整合微生物组菌剂营养成分分析

整合微生物组菌剂产品营养成分测定结果见表 1, 水分含量范围 27.60%—33.60%, 平均值 29.74%;

pH 范围 6.2—9.5, 平均值 7.56; 有机质含量范围 38.90%—48.50%, 平均值 44.46%; 全氮含量范围 2.00%—2.62%, 平均值 2.23%; 腐殖酸含量范围 9.31%—12.90%, 平均值 11.20%; 粗纤维含量范围 11.30%—17.80%, 平均值 14.06%。

2.2 整合微生物组菌剂芽孢杆菌总活菌数测定

从采集的 7 个整合微生物组菌剂产品样品中分离标记的 100 个菌落类型, 经过 16S rRNA 鉴定, 相似度 >97%, 初步鉴定为 23 种 (亚种) 芽孢杆菌和 2 株疑似新种的芽孢杆菌 (表 2); 芽孢杆菌活菌数测定结果见表 3, 样品的芽孢杆菌活菌总数平均值范围为 (17.67—26.67) × 10⁷ cfu/g, 整合微生物组菌剂产品活菌数平均值达 20.62 × 10⁷ cfu/g。

表 1 整合微生物组菌剂营养成分分析

Table 1 Nutrient components analysis of the integrated microbiome agent

样品序号	水分含量	pH	有机质	全氮	腐殖酸	粗纤维
Sample number	Water content (%)		Organic material (%)	Total nitrogen (%)	Humic acid (%)	Coarse fiber (%)
g1	31.60	9.20	45.30	2.42	11.10	11.40
g2	27.60	7.10	38.90	2.31	9.31	11.30
g3	27.70	6.30	45.90	2.00	9.88	17.80
g4	33.60	6.20	45.10	2.10	11.40	14.80
g5	31.40	9.50	42.20	2.08	12.70	12.80
g6	28.70	8.10	45.30	2.62	12.90	13.00
g7	27.60	6.50	48.50	2.09	11.10	17.30
平均值 Average	29.74	7.56	44.46	2.23	11.20	14.06

表 2 整合微生物组菌剂产品样品芽孢杆菌种类鉴定

Table 2 Identification of *Bacillus*-like species in the product of the integrated microbiome agent

菌落编号	菌株编号	标准菌株学名	16S rDNA 相似度
Colony number	Strain number	Name of <i>Bacillus</i> -like species	16S rDNA similarity (%)
1.	FJAT-46225	[1] 芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	97.13
2.	FJAT-46301	[2] 嗜气芽孢杆菌 <i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	100.00
3.	FJAT-46217		100.00
4.	FJAT-46253	[3] 高地芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	100.00
5.	FJAT-46318	[4] 解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 ^T	99.72
6.	FJAT-46213	[5] 蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	99.70
7.	FJAT-46201		99.64
8.	FJAT-46307	[6] 阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T	100.00
9.	FJAT-46281		97.89
10.	FJAT-46278		100.00
11.	FJAT-46272		100.00
12.	FJAT-46223		100.00
13.	FJAT-46186		99.86
14.	FJAT-46270	[7] 克劳氏芽孢杆菌 <i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 ^T	99.50
15.	FJAT-46194		99.20

续表 2 Continued table 2

菌落编号 Colony number	菌株编号 Strain number	标准菌株学名 Name of <i>Bacillus</i> -like species	16S rDNA 相似度 16S rDNA similarity (%)
16.	FJAT-46263	[8] 蚯蚓芽孢杆菌 <i>Bacillus eiseniae</i> A1-2 ^T	99.58
17.	FJAT-46178		99.72
18.	FJAT-46289	[9] 丝状芽孢杆菌 <i>Bacillus filamentosus</i> SGD-14 ^T	100.00
19.	FJAT-46204		100.00
20.	FJAT-46297	[10] 柯赫芽孢杆菌 <i>Bacillus kochii</i> WCC 4582 ^T	99.93
21.	FJAT-46258		99.79
22.	FJAT-46246		100.00
23.	FJAT-46230		99.65
24.	FJAT-46221		99.65
25.	FJAT-46208		99.72
26.	FJAT-46202		99.86
27.	FJAT-46176		98.86
28.	FJAT-46175		99.72
29.	FJAT-46313	[11] 地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	99.10
30.	FJAT-46312		99.30
31.	FJAT-46296		99.70
32.	FJAT-46271		99.37
33.	FJAT-46268		99.23
34.	FJAT-46266		99.37
35.	FJAT-46260		99.40
36.	FJAT-46244		99.72
37.	FJAT-46239		99.30
38.	FJAT-46237		97.70
39.	FJAT-46235		99.16
40.	FJAT-46233		99.37
41.	FJAT-46218		98.30
42.	FJAT-46215		99.65
43.	FJAT-46212		97.50
44.	FJAT-46203		99.93
45.	FJAT-46200		99.72
46.	FJAT-46196		99.79
47.	FJAT-46188		99.60
48.	FJAT-46182		99.70
49.	FJAT-46180		99.60
50.	FJAT-46173		99.23
51.	FJAT-46197	[12] 甲基营养型芽孢杆菌 <i>Bacillus methylotrophicus</i> KACC 13105 ^T	100.00
52.	FJAT-46274	[13] 根际芽孢杆菌 <i>Bacillus rhizosphaerae</i> SC-N012 ^T	99.09
53.	FJAT-46174	[14] 沙福芽孢杆菌 <i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	100.00
54.	FJAT-46311	[15] 索诺拉沙漠芽孢杆菌 <i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T	99.44
55.	FJAT-46255		99.30
56.	FJAT-46199		99.37
57.	FJAT-46177		99.44

续表 2 Continued table 2

菌落编号	菌株编号	标准菌株学名	16S rDNA 相似度
Colony number	Strain number	Name of <i>Bacillus</i> -like species	16S rDNA similarity (%)
58.	FJAT-46316	[16] 枯草芽孢杆菌茵氏亚种 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T	99.72
59.	FJAT-46298		99.93
60.	FJAT-46295		99.93
61.	FJAT-46279		99.93
62.	FJAT-46259		99.93
63.	FJAT-46252		99.79
64.	FJAT-46251		99.72
65.	FJAT-46248		99.93
66.	FJAT-46247		99.93
67.	FJAT-46242		99.79
68.	FJAT-46238		99.93
69.	FJAT-46231		99.93
70.	FJAT-46229		99.93
71.	FJAT-46220		99.37
72.	FJAT-46211		99.93
73.	FJAT-46206		99.93
74.	FJAT-46185		99.79
75.	FJAT-46184		99.93
76.	FJAT-46262	[17] 枯草芽孢杆菌枯草亚种 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ^T	99.93
77.	FJAT-46241		99.93
78.	FJAT-46234		99.93
79.	FJAT-46219		99.93
80.	FJAT-46214		99.93
81.	FJAT-46190		99.93
82.	FJAT-46179		99.93
83.	FJAT-46314	[18] 特基拉芽孢杆菌 <i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	100.00
84.	FJAT-46257		100.00
85.	FJAT-46250		99.79
86.	FJAT-46216		100.00
87.	FJAT-46191	[19] 人参哈格瓦氏菌 <i>Bhargavaea ginsengige</i> 14 ^T	99.86
88.	FJAT-46249		99.79
89.	FJAT-46227		99.93
90.	FJAT-46224		99.93
91.	FJAT-46192	[20] 赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus</i> sp.	99.79
92.	FJAT-46276		97.76
93.	FJAT-46275	[21] 淤泥大洋芽孢杆菌 <i>Oceanobacillus caeni</i> S-11 ^T	99.30
94.	FJAT-46254	[22] 拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌 <i>Ornithinibacillus scapharcae</i> TW25 ^T	98.47
95.	FJAT-46303	[23] 盐反硝化枝芽孢杆菌 <i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM10037 ^T	99.79
96.	FJAT-46195	[24] 海洋枝芽孢杆菌 <i>Virgibacillus oceani</i> MY11 ^T	99.86
97.	FJAT-46309		98.70
98.	FJAT-46232		98.30
99.	FJAT-46198		98.29
100.	FJAT-46222	[25] 盐湖枝芽孢杆菌 <i>Virgibacillus salinus</i> XH-22 ^T	98.48

表 3 整合微生物组菌剂芽孢杆菌活菌计数

Table 3 Colony forming unit of the *Bacillus*-like species taken from the integrated microbiome agent

样本编号 Sample number	芽孢杆菌活菌计数 Colony forming unit of <i>Bacillus</i> species ($\times 10^7$ cfu/g)			平均值 Average ($\times 10^7$ cfu/g)
	重复 I Rep1	重复 II Rep2	重复 III Rep3	
g1	20	31	29	26.67
g2	23	18	22	21.00
g3	19	16	18	17.67
g4	26	18	21	21.67
g5	18	19	18	18.33
g6	21	15	19	18.33
g7	19	22	21	20.67
平均值 Average ($\times 10^7$ cfu/g)	20.85	19.85	21.14	20.62

2.3 基于宏基因组整合菌剂产品细菌微生物组测定

2.3.1 整合微生物组菌剂产品宏基因组测序 基于宏基因分析整合菌剂细菌微生物组测定结果见表 4。对采集的样本分析结果表明，样品短序列数平均值为 99 701.75，种类数即分类操作单元（operational taxonomic units, OTU）平均值为 1 469.29，代表细菌微生物组的种类；Ace 指数和 Chao 指数代表物种指

数，平均值分别为 1 726.42 和 1 757.57，指示着细菌物种的数量，是种类（OTU）数量的校正值；测序深度指数（Coverage）平均值为 0.9972，表明测序深度已经基本覆盖到样本中所有的物种；香农指数（Shannon）为 5.0686，表明细菌物种的多样性较高，辛普森指数（Simpson）为 0.0188，表明物种优势度较低，即无单一物种占有绝对优势。

表 4 基于宏基因组分析整合菌剂细菌微生物组测定

Table 4 Determination of bacterial microbiome for the integrated microbiome agent based on metagenome analysis

样本 Sample	短序列 Reads	种类 OTUs	在 0.97 的相似度下 Under the similarity of 0.97				
			Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	测序深度指数 Coverage index	香农多样性指数 Shannon index	辛普森优势度指数 Simpson index
g1	102575	1608	1824 (1779, 1882)	1879 (1809, 1973)	0.997114	5.14 (5.13, 5.15)	0.0212 (0.0208, 0.0216)
g2	129891	1698	1922 (1875, 1981)	1973 (1902, 2068)	0.997721	5.55 (5.54, 5.55)	0.0101 (0.01, 0.0103)
g3	83279	1255	1604 (1536, 1689)	1592 (1511, 1700)	0.995845	4.68 (4.67, 4.70)	0.0252 (0.0248, 0.0255)
g4	137195	1192	1381 (1337, 1438)	1421 (1356, 1512)	0.998287	4.85 (4.85, 4.86)	0.0187 (0.0185, 0.0189)
g5	119811	1711	1997 (1942, 2067)	2047 (1966, 2153)	0.997087	5.11 (5.10, 5.12)	0.0255 (0.0251, 0.026)
g6	111290	1257	1566 (1503, 1646)	1574 (1493, 1683)	0.997232	4.96 (4.95, 4.97)	0.0153 (0.0151, 0.0155)
g7	113573	1564	1791 (1744, 1851)	1817 (1752, 1904)	0.997385	5.19 (5.17, 5.20)	0.0159 (0.0157, 0.0161)
平均值 Average	99701.75	1469.29	1726.42	1757.57	0.997239	5.0686	0.0188

2.3.2 整合菌剂门水平细菌微生物组序列数(reads) 分布 7 个样本的整合微生物组菌剂分析结果表明其含有 39 个门细菌；不同样本差异显著，序列数范围在 83 279—137 195，平均值为 113 944.85；前 7 个细菌门 reads 平均值总和为 108 242.43，占比 95%；按大小排序 7 个细菌门分别为拟杆菌门（Bacteroidetes，

reads=30 783.14）、变形菌门（Proteobacteria，27 106.29）、放线菌门（Actinobacteria，19 740.00）、厚壁菌门（Firmicutes，10 725.29）、糖化细菌门（Saccharibacteria，8 005.00）、异常球菌-栖热菌门（Deinococcus-Thermus，6 360.71）、绿弯菌门（Chloroflexi，5 522.00）（图 2）。

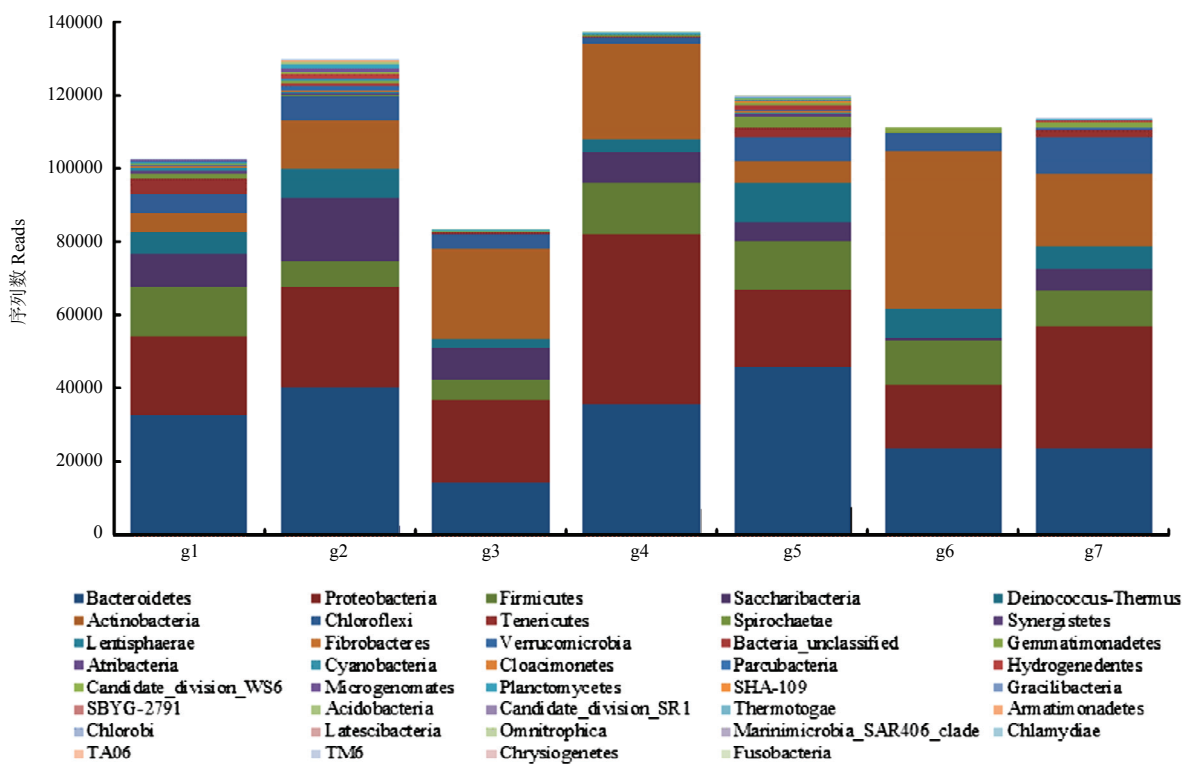


图 2 整合菌剂门水平细菌微生物组序列数 (reads)

Fig. 2 Quantity reads of bacteria microbiome at the phylum level of the integrated microbiome agent

2.3.3 整合菌剂细菌微生物组各分类阶元种类(OTU)数量 整合菌剂细菌微生物组各分类阶元种类(OTU)数量分别为细菌门 39 个,细菌纲 96 个,细菌目 189 个,细菌科 383 个,细菌属 786 个,细菌种 1 281 个;表明整合微生物组菌剂含有丰富的细菌种类,每克菌剂含有细菌 1 281 种。

2.3.4 整合微生物组菌剂前 10 种序列数 (reads) 含量高的细菌种类 序列数含量较高的前 10 种细菌分别属于:藤黄色杆菌属(*Luteibacter* sp., reads=8 067.71)、糖杆菌门某属(*Saccharibacteria*, 7 937.00)、特吕珀菌属(*Truepera* sp., 5 771.86)、漠河杆菌属(*Moheibacter* sp., 5 552.14)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp., 4 261.14)、鞘脂杆菌属(*Crenotalea* sp., 3 443.43)、腐螺旋菌属(*Saprospira* sp, 2 718.86)、海杆菌属(*Marinobacter* sp., 2 324.71)、海洋球菌属(*Oceanococcus* sp., 1 916.43)、鸟杆菌属(*Ornithobacterium* sp., 1 665.85), 前 10 种细菌序列数的总和为 43 659.14, 占比整合微生物组菌剂 1 281 种细菌总序列量 113 944.90 的 38.31%。

2.3.5 整合微生物组菌剂芽孢杆菌种类丰度 从 7 个样本中共检测到 46 种芽孢杆菌,各样本芽孢杆菌种类分度差异显著,芽孢杆菌丰度总和范围在 0.4244%—3.5710%;前 10 种高丰度芽孢杆菌分别为芽孢杆菌 2 (*Bacillus* sp.2, 丰度=0.4698%)、乳杆菌 1 (*Lactobacillus* sp.1, 0.2557%)、食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*, 0.2144%)、肿块芽孢杆菌(*Tuberibacillus* sp., 0.1364%)、纤细芽孢杆菌(*Gracilibacillus* sp., 0.057%)、地芽孢杆菌 1 (*Geobacillus* sp.1, 0.0529%)、嗜盐盐乳芽孢杆菌(*Halolactibacillus halophilus*, 0.0429%)、类芽孢杆菌 2 (*Paenibacillus* sp.2, 0.031%)、加利福尼亚鸟氨酸芽孢杆菌(*Ornithinibacillus californiensis*, 0.0152%)、少盐芽孢杆菌 3 (*Paucisali bacillus* sp.3, 0.013%);46 种芽孢杆菌总丰度为 1.4244%(表 5)。

在检测到的 46 种芽孢杆菌中有 9 种芽孢杆菌未见国内研究报道,分别为:(1)嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*),由印度学者 SHIVAJI 等^[21]从空气采集的样本中分离鉴定的新种;(2)蚯蚓芽孢杆菌(*Bacillus eiseniae*),由韩国学者 HONG 等^[22]从蚯蚓肠道分

表 5 整合微生物组菌剂产品中芽孢杆菌种类丰度

Table 5 The species richness of *Bacillus*-like species in the integrated microbiome agent

种名 Species name	丰度 Species richness (%)							平均值 Average (%)
	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	
[1] 穿琼脂氨芽孢杆菌 <i>Ammoniibacillus agariperforans</i>	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0162	0.0000	0.0025
[2] 兼性芽孢杆菌 <i>Amphibacillus</i> sp.	0.0000	0.0000	0.0060	0.0160	0.0000	0.0036	0.0018	0.0039
[3] 解硫胺素芽孢杆菌 <i>Aneurinibacillus</i> sp.	0.0000	0.0008	0.0048	0.0000	0.0000	0.0009	0.0000	0.0009
[4] 产氮芽孢杆菌 <i>Bacillus azotoformans</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[5] 草坪芽孢杆菌 <i>Bacillus graminis</i>	0.0010	0.0023	0.0036	0.0015	0.0008	0.0018	0.0000	0.0016
[6] 土地芽孢杆菌 <i>Bacillus humi</i>	0.0010	0.0008	0.0084	0.0015	0.0025	0.0234	0.0009	0.0055
[7] 深层芽孢杆菌 <i>Bacillus infernus</i>	0.0039	0.0054	0.0144	0.0036	0.0025	0.0036	0.0343	0.0097
[8] 芽孢杆菌 1 <i>Bacillus</i> sp.1	0.0000	0.0108	0.0000	0.0000	0.0659	0.0009	0.0009	0.0112
[9] 芽孢杆菌 2 <i>Bacillus</i> sp.2	0.0614	0.2079	1.2836	0.4665	0.1327	0.7332	0.4033	0.4698
[10] 热乳芽孢杆菌 <i>Bacillus thermolactis</i>	0.0010	0.0062	0.0120	0.0036	0.0025	0.0108	0.0158	0.0074
[11] 热碱芽孢杆菌 <i>CaldalkaLibacillus</i> sp.	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0008	0.0099	0.0018	0.0020
[12] 脱硫芽孢杆菌 <i>Desulfuribacillus</i> sp.	0.0088	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000	0.0014
[13] 地芽孢杆菌 1 <i>Geobacillus</i> sp.1	0.0000	0.0054	0.0012	0.0000	0.0017	0.3603	0.0018	0.0529
[14] 嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0.0000	0.0015	0.0012	0.0029	0.0017	0.0018	0.0009	0.0014
[15] 纤细芽孢杆菌 <i>Gracilibacillus</i> sp.	0.0029	0.0100	0.0036	0.0058	0.0017	0.3423	0.0326	0.0570
[16] 喜盐芽孢杆菌 <i>Halobacillus</i> sp.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[17] 嗜盐盐乳芽孢杆菌 <i>Halolactibacillus halophilus</i>	0.0556	0.0031	0.0108	0.1844	0.0225	0.0117	0.0123	0.0429
[18] 盐乳芽孢杆菌 <i>Halothiobacillus</i> sp.	0.0010	0.0000	0.0012	0.0146	0.0000	0.0018	0.0044	0.0033
[19] 食淀粉乳杆菌 <i>Lactobacillus amylovorus</i>	0.1950	0.0254	0.0588	0.0722	0.0250	1.0145	0.1101	0.2144
[20] 动物乳杆菌 <i>Lactobacillus animalis</i>	0.0010	0.0023	0.0000	0.0036	0.0000	0.0036	0.0000	0.0015
[21] 乳杆菌新种 <i>Lactobacillus equicursoris</i>	0.0010	0.0062	0.0000	0.0007	0.0000	0.0584	0.0044	0.0101
[22] 粘膜乳杆菌 <i>Lactobacillus mucosae</i>	0.0000	0.0008	0.0000	0.0015	0.0000	0.0306	0.0000	0.0047
[23] 清酒乳杆菌 <i>Lactobacillus sakei</i>	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
[24] 乳杆菌 1 <i>Lactobacillus</i> sp.1	0.3246	0.0477	0.1465	0.4497	0.0209	0.6676	0.1330	0.2557
[25] 小鱈鱼大洋芽孢杆菌 <i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
[26] 大洋芽孢杆菌 1 <i>Oceanobacillus</i> sp.1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0066	0.0000	0.0045	0.0026	0.0020
[27] 大洋芽孢杆菌 2 <i>Oceanobacillus</i> sp.2	0.0049	0.0023	0.0024	0.0117	0.0000	0.0521	0.0070	0.0115
[28] 加利福尼亚鸟氨酸芽孢杆菌 <i>Ornithinibacillus californiensis</i>	0.0049	0.0154	0.0144	0.0117	0.0008	0.0279	0.0317	0.0152
[29] 鸟氨酸芽孢杆菌 DX-3 <i>Ornithinibacillus</i> sp. DX-3	0.0019	0.0008	0.0060	0.0022	0.0025	0.0350	0.0352	0.0120
[30] 鸟氨酸芽孢杆菌 GD05 <i>Ornithinibacillus</i> sp. GD05	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0005
[31] 鸟氨酸芽孢杆菌 HME7715 <i>Ornithinibacillus</i> sp. HME7715	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0180	0.0000	0.0026
[32] 类芽孢杆菌 1 <i>Paenibacillus</i> sp.1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0062	0.0009
[33] 类芽孢杆菌 2 <i>Paenibacillus</i> sp.2	0.0078	0.0331	0.0096	0.0204	0.0150	0.0494	0.0819	0.0310
[34] 少盐芽孢杆菌 1 <i>Paucisalibacillus</i> sp.1	0.0000	0.0000	0.0024	0.0000	0.0008	0.0009	0.0009	0.0007
[35] 少盐芽孢杆菌 2 <i>Paucisalibacillus</i> sp.2	0.0029	0.0115	0.0060	0.0087	0.0025	0.0099	0.0123	0.0077

续表 5 Continued table 5

种名 Species name	丰度 Species richness (%)							平均值 Average (%)
	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	
[36] 少盐芽孢杆菌 3 <i>Paucisolibacillus</i> sp.3	0.0049	0.0000	0.0072	0.0095	0.0025	0.0584	0.0088	0.0130
[37] 厚胞鲁梅尔芽孢杆菌 <i>Rummeliibacillus pycnus</i>	0.0146	0.0062	0.0048	0.0073	0.0000	0.0045	0.0018	0.0056
[38] 森林土壤芽孢杆菌 <i>Solibacillus silvestris</i>	0.0049	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0000	0.0008
[39] 硫化芽孢杆菌 <i>Sulfobacillus</i> sp.	0.0000	0.0023	0.0024	0.0000	0.0000	0.0000	0.0018	0.0009
[40] 热芽孢杆菌 1 <i>Thermobacillus</i> sp.1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0000	0.0114	0.0018
[41] 热芽孢杆菌 2 <i>Thermobacillus</i> sp.2	0.0000	0.0069	0.0024	0.0000	0.0008	0.0036	0.0018	0.0022
[42] 热芽孢杆菌 3 <i>Thermobacillus</i> sp.3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
[43] 热生肿块芽孢杆菌 <i>Tuberibacillus calidus</i>	0.0000	0.0008	0.0024	0.0029	0.0000	0.0009	0.0106	0.0025
[44] 肿块芽孢杆菌 <i>Tuberibacillus</i> sp.	0.0000	0.0000	0.0216	0.8951	0.0000	0.0000	0.0379	0.1364
[45] 尿素芽孢杆菌 <i>Ureibacillus</i> sp.	0.0058	0.0023	0.0000	0.0000	0.0008	0.0054	0.0141	0.0041
[46] 火山芽孢杆菌 <i>Vulcanibacillus</i> sp.	0.0273	0.0008	0.0000	0.0153	0.0442	0.0027	0.0009	0.0130
总和 Total	0.7381	0.4244	1.6377	2.2195	0.3527	3.5710	1.0278	1.4244

离鉴定的新种；（3）丝状芽孢杆菌（*Bacillus filamentosus*），由印度学者 SONALKAR 等^[23]从海洋沉积物分离的新种；（4）柯赫芽孢杆菌（*Bacillus kochii*），由德国学者 SEILER 等^[24]从食品药物加工厂分离的新种；（5）根际芽孢杆菌（*Bacillus rhizosphaerae*），由印度学者 MADHAIYAN 等^[25]从甘蔗根际土壤分离的新种；（6）长型赖氨酸芽孢杆菌（*Lysinibacillus macroides*），由比利时学者 COOREVITS 等^[26]1947 年从收集的牛粪中分离的菌株继续鉴定获得的新种；（7）淤泥大洋芽孢杆菌（*Oceanobacillus caeni*），由韩国学者 NAM 等^[27]从污水处理系统中分离的新种；（8）拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌（*Ornithinibacillus scapharcae*），由韩国学者 SHIN 等^[28]从海边死亡的贝壳中分离的新种；（9）海洋枝芽孢杆菌（*Virgibacillus oceani*），由中国学者 YIN 等^[29]从西太平洋沉积物中分离的新种。上述 9 个种为中国新

记录种。另有 2 个种，即（10）盐湖枝芽孢杆菌（*Virgibacillus salinus*），由西班牙学者 CARRASCO 等^[30]从中国内蒙古锡林浩特盐湖中分离的新种；（11）香草豆芽孢杆菌（*Bacillus vanilla*），由中国学者 CHEN 等^[31]从海南香草豆中分离的新种，尽管在国内的研究未见报道，但它们属于国内环境采集的种类，为中国分布种。

2.4 整合微生物组菌剂对种子发芽的影响

处理组绿豆发芽率和发芽指数与清水对照无显著差异（ $P>0.05$ ），但处理组绿豆胚根长平均值为对照组的 1.58 倍，差异极显著（ $P<0.01$ ）；相比对照组，处理组绿豆活力指数提高了 56.26%，差异极显著（ $P<0.01$ ）（表 6、附图 2）。因此，整合微生物组菌剂产品浸出液对绿豆发芽无影响，但能明显促进绿豆根长的生长，提高活力指数。

表 6 整合微生物组菌剂对绿豆发芽的影响

Table 6 Effect of the integrated microbiome agent on germination of mung bean (24 h)

处理 Treatment	发芽率 Germination rate (%)	胚根长 Radical length (RL, cm)		发芽指数 Germination index (GI)		活力指数 Vigor index (VI)	
		RL	比值 Ratio	GI	比值 Ratio	VI	比值 Ratio
整合菌剂 IMA	96.67±2.11a	2.64±0.77A	1.5808	57.67a	0.9885	152.25±13.29A	1.5626
清水对照 CK	98.33±1.53a	1.67±0.23B	1.0000	58.34a	1.0000	97.43±10.67B	1.0000

同列数据后含有不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ），含有不同大写字母表示差异极显著（ $P<0.01$ ）。下同
The different lowercase letters in the same column after the data indicate significant difference ($P<0.05$), the different capital letters in the same column indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same as below

2.5 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗壮苗作用的影响

育苗基质中整合菌剂添加量大时，显著抑制番茄苗的出苗率，与对照出苗率 86.20%相比，出苗率降至 9.04%—46.10%；同时抑制了番茄根长（0.70—1.45 cm）、株高（1.50—6.23 cm）和茎粗（0.70—1.05 cm）。整合菌剂中浓度添加时，番茄的出苗率（85.30%—86.03%）、根长（4.45—4.85 cm）、株高（9.67—9.78 cm）、茎粗（1.45—1.56 cm）与对照相比无显著差异。整合菌剂低含量添加时，能显著提高番茄出苗率 3.0%，增加株高生长 25.1%，而对根长和茎粗影响不显著（表 7）。

表 7 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗的影响

Table 7 Effect of the integrated microbiome agent on culture of tomato seedling (30 d)

处理组 Treatment	处理编号 Treatment number	整合菌剂含量 IMA percent (%)	番茄种苗生长状况 Growth of tomato seedlings			
			出苗率 Emergence rate (%)	根长 Root length (cm)	株高 Plant height (cm)	茎粗 Stem diameter (cm)
高含量组 High content group	处理 1 Treatment 1	30	9.04	0.70	1.50	0.70
	处理 2 Treatment 2	25	46.10	1.45	6.23	1.05
	平均值 Average	—	27.57c	1.08b	3.87c	0.88b
中含量组 Middle content group	处理 3 Treatment 3	20	85.30	4.45	9.78	1.56
	处理 4 Treatment 4	15	86.03	4.85	9.67	1.45
	平均值 Average	—	85.67b	4.65a	9.73b	1.51a
低含量组 Low content group	处理 5 Treatment 5	10	89.50	4.73	10.67	1.49
	处理 6 Treatment 6	5	88.90	4.62	11.92	1.51
	平均值 Average	—	89.20a	4.68a	11.30a	1.50a
空白对照 CK	对照 CK	0	86.20b	4.68a	9.03b	1.40a

表 8 整合微生物组菌剂对番茄种苗青枯病防控的影响

Table 8 Effect of the integrated microbiome agent on the control efficiency of tomato bacterial wilt

处理组 Treatment	处理编号 Treatment number	整合菌剂含量 IMA percent (%)	出苗 30 d 后接种青枯病原菌液 Inoculation of <i>R. solanacearum</i> 30 days after emergence (10 ⁶ cfu/mL)			10 d 校正防效 Corrected control efficacy of 10 d (%)
			4 d 后发病率 Incidence after 4 d (%)	7 d 后发病率 Incidence after 7 d (%)	10 d 后发病率 Incidence after 10 d (%)	
高含量组 High content group	处理 1 Treatment 1	30	—	—	—	
	处理 2 Treatment 2	25	6.25	23.00	66.67	
	平均值 Average	—	6.25b	23.00a	66.67a	17.88
中含量组 Middle content group	处理 3 Treatment 3	20	6.47	13.33	32.40	
	处理 4 Treatment 4	15	8.33	16.57	28.50	
	平均值 Average	—	7.40ab	14.95b	30.45ab	62.49
低含量组 Low content group	处理 5 Treatment 5	10	6.67	14.47	18.30	
	处理 6 Treatment 6	5	6.67	13.33	15.14	
	平均值 Average	—	6.67b	13.90b	16.72b	79.41
空白对照 CK	对照 CK	0	11.11a	33.33a	88.89a	—

2.6 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗青枯病防控的影响

用整合菌剂配制的育苗基质培育番茄种苗，在出苗 30 d 后继续做接种防病试验，用强致病力青枯雷尔氏菌菌液（10⁶ cfu/mL）灌根接种，结果表明除了高含量整合菌剂处理 1 因出苗率低无法统计，其余处理接菌后 4 d 开始发病，随着时间进程发病率逐渐增加，10 d 达到高峰；在发病高峰期（10 d），对照组（CK）发病率达 88.89%，高含量整合菌剂处理组平均发病率为 66.67%，校正防效达 17.88%；中含量整合菌剂处理组平均发病率为 30.45%，校正防效为 62.49%，低含量整合菌剂处理组平均发病率为 16.72%，校正防效为 79.41%；青枯病防治效果为高含量组<中含量组<低含量组（表 8、图 3）。



图 3 整合微生物组菌剂对番茄穴盘育苗及青枯病防控的影响

Fig. 3 Effect of the integrated microbiome agent on tomato plug seedling and biocontrol of bacterial wilt

3 讨论

3.1 整合微生物组菌剂提出、研发与应用

近年来,微生物组的研究成为热点,微生物在环境中都以微生物组的形式出现和发挥作用。肠道微生物组影响着动物和人类的健康^[32],海洋微生物组平衡着水体生态系统^[33],土壤微生物组主导着土壤肥力和植物健康^[34],等等。作者提出整合微生物组概念,通过发酵床将猪粪废弃物发酵产生整合微生物组,加工成菌剂,利用整合微生物组菌剂补充到土壤中,提升土壤微生物组的健康水平,影响土壤微生物组的演替,使之朝着有利于土壤肥力发挥、病害生物防治以及植物健康生长方向进行,保障土壤肥力和抑制病害发生,同时起到生物肥料和生物农药的作用。作为“农药肥料双减行动”替代品具有重要价值,也是畜禽粪便资源高质化利用的一条重要途径。

畜禽粪便与农业秸秆结合等农业废弃物生产生物有机肥方式得到极大的发展。通过堆肥方式,将农业废弃物通过发酵转化成腐殖质(有机肥)的研究有较多报道^[35-37]。李季^[38]报道了堆肥发酵接种剂及规模化生物有机肥;张发宝等^[39]报道了畜禽粪好氧堆肥产品的理化性质及生物效应;田旻等^[40]报道了秸秆与污泥混合堆肥。上述研究从堆肥原料、营养添加、通气控制、菌种筛选等角度进行生物有机肥的生产,然而农业废弃物经过充分的堆肥腐熟,损失了大量的微生物组,有效微生物活菌数大幅度下降,最终

产品有效活菌数虽然满足生物有机肥农业行业标准(NY884-2012),但是有效活菌数均在 2×10^7 cfu/g 左右。畜禽粪便的堆肥发酵与整合微生物组菌剂发酵存在着较大差异,堆肥是按粪污与秸秆的碳氮比配方,一次添加混合发酵腐熟,最终杀灭了大量的微生物;整合微生物组菌剂发酵是利用发酵床进行粪污氮素营养连续流加,逐步添加到发酵结束,产生并保存了丰富的微生物组。

作者提出整合微生物组菌剂(简称整合菌剂)的概念,利用固体耗氧发酵条件控制(培养基和通气量)和畜禽粪污氮素连续流加技术,在保障菌剂产品有机质含量的基础上,使得微生物含量最大化;整合菌剂的生产过程中,发酵床微生物组在充足营养和通气的条件下迅速生长发酵,经过 20 d 发酵,取出上层发酵垫料加工形成整合菌剂,方法简便易行,结合了发酵床养猪过程,有效地利用猪粪资源好氧发酵生产高值化整合菌剂;整合菌剂含水量 29.74%, pH 7.56,有机质含量 44.46%,全氮含量 2.23%,腐殖酸含量 11.20%,粗纤维含量 14.06%,芽孢杆菌活菌数达 2.062×10^8 cfu/g;产品形态与生物有机肥类似,满足生物有机肥中国农业行业标准(NY884-2012)有机质含量 $>40\%$,含水量 $<30\%$,pH 5.5—7.5 的规定,有效活菌数(仅统计芽孢杆菌)是生物有机肥的 10 倍以上,达到高有机质含量和高活菌数的目的,较少的用量即可促进植物发芽生长,防病抗病。同时,整合菌剂添加不同的垫料(培养基),如豆饼粉、

红糖、玉米粉等，会影响产品微生物组的组成，相关研究将另文报道。

3.2 整合微生物组菌剂中的细菌微生物组检测

整合菌剂每克菌剂含有细菌门 39 个，细菌纲 96 个，细菌目 189 个，细菌科 383 个，细菌属 786 个，细菌种 1 281 个。前 7 个细菌门含量总和为 108 242.43，占比 95%。前 10 种高含量细菌占比整合微生物组菌剂 1 281 种细菌总量的 38.31%，成为整合菌剂主要的功能细菌微生物组。许多学者对有机肥的发酵工艺及其中的常见功能微生物进行了深入研究^[26,41-43]，在发酵过程中添加功能微生物菌剂，能够丰富有机肥中的功能微生物，增强肥效。然而，堆肥过程是天然接菌的过程，调整好营养和条件，发酵物料会自动地选择微生物组成，添加进去的微生物对堆肥发酵过程影响较弱，培养基成分变化、堆肥发酵条件、堆肥腐熟时间等的变化影响着堆肥产品微生物组的组成，添加进去的微生物和产品中的微生物种类和数量没有必然联系。传统堆肥过程后期微生物组含量大幅度下降，整合微生物组菌剂生产过程则在微生物组含量最高的时候结束发酵，保持了产品中微生物的最高含量。整合菌剂产品中芽孢杆菌活菌数为 2.062×10^8 cfu/g，宏基因组测定显示芽孢杆菌总丰度为 1.42%，推算整合微生物组菌剂的有效细菌含量可达 1.45×10^{10} cfu/g；整合微生物组菌剂产品很好地结合了生物有机肥和微生物肥料的特点，为整合微生物组菌剂的应用创造了良好的条件。

3.3 整合微生物组菌剂中芽孢杆菌的分离

通过活菌分离和宏基因组检测，得出整合微生物组菌剂产品中含有大量的芽孢杆菌；由于芽孢杆菌生长培养特性以及分离含量极限等差异，两种方法分离检测到的芽孢杆菌种类数量有较大差异；可培养方法分离到芽孢杆菌 23 种（亚种）和 2 株疑似新种的芽孢杆菌，总含量为 2.062×10^8 cfu/g；宏基因组测定方法检测到芽孢杆菌 46 个种，总丰度为 1.42%，即芽孢杆菌占整个细菌微生物组的 1.42%。其中，9 个种未见国内分离和研究的报道。芽孢杆菌能产生芽孢，具有良好的保存特性，同时芽孢杆菌能解磷解钾、分解有机物、抗病防病、促进植物生长等。国内学者通过堆肥培养基调配、发酵工艺调控、菌种添加等方法来促进生物有机肥腐熟，增加芽孢杆菌数量，从而提高生物有机肥的应用效果。整合微生物菌剂的提出适应了生物有机肥发展的方向，通过二次固体发酵，增加了菌剂中的芽孢杆菌

种类和数量，为菌剂应用范围和效果的提升提供了条件。

3.4 整合微生物组菌剂中猪病原菌风险分析

生物有机肥技术指标中有粪大肠菌群数的指标，对于限制动物病原数量具有重要作用。由于整合微生物组菌剂生产过程是好氧发酵的过程，充分利用发酵床猪粪发酵垫料的微生物组和有机质基础，通过好氧中温发酵，为好氧菌的生长创造了较好的条件，从而限制了以厌氧菌为主的畜禽病原的发展；猪重要病原菌几乎营厌氧或兼性好氧环境生长，通过对整合菌剂产品的宏基因组检测未发现重要猪病原的细菌属，如胸膜肺炎放线杆菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*）、支气管败血波氏杆菌（*Brodetella bronchiseptica*）、猪布氏杆菌（*Brucella suis*）、副猪嗜血杆菌（*Haemophilus parasuis*）、细胞内劳森氏菌（*Lawsonia intracellularis*）、多杀巴氏杆菌（*Pasteurella multocida*）、猪霍乱沙门氏菌（*Salmonella cholerae*）等所在的细菌属；能检测到疑似猪病原细菌属，如梭菌属（*Clostridium*）、丹毒丝菌属（*Erysipelothrix*）、格鲁比卡菌属（*Globicatella*）、假单胞杆菌属（*Pseudomonas*）等，但检测不到相应的猪病原菌种类的存在，如检测不到产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）、猪丹毒菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*）、血格鲁比卡菌（*Globicatella sanguinis*）、绿脓假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）等；甚至连常见的大肠杆菌（*Escherichia coli*）也检测不到，这与陈倩倩等^[44]报道的发酵床发酵程度 II 级以上（中等发酵程度）的垫料分离不到猪大肠杆菌的结果是一致的。在整合菌剂中检测不到猪细菌性病原的原因和菌剂的耗氧发酵、营养配方、菌剂加工等操作存在一定的关系，同时与整合菌剂中微生物种群竞争存在关系，整合菌剂的生产过程一并消除了猪病原携带的风险。

3.5 整合微生物组菌剂对种子发芽、种苗生长和病害防控的影响

排除整合微生物组菌剂对植物是否有毒害的第一步就是测定其对种子发芽的影响，以绿豆作为材料进行种子萌发试验，被广泛采用于测定制剂对种子发芽的影响，如测定龙血竭制剂^[45]、肌苷^[46]、青霉素^[47]、根际微生物^[48]等对绿豆发芽率的影响。本研究发现，利用整合菌剂 25% 浸出液处理绿豆种子能够促进绿豆根的生长，整合微生物组菌剂对绿豆种子发芽无害。不同作物种子对整合微生物组菌剂的反应不同，

有待于进一步研究。番茄基质育苗是保障壮苗的关键。利用基础基质(椰糠),添加不同浓度的整合微生物组菌剂,配制成育苗基质,研究对番茄育苗和青枯病防控的影响,结果表明整合微生物组菌剂不仅能提高番茄出苗率,促进株高生长,而且可以有效防控青枯病;在育苗基质中的整合菌剂用量为 5%—10% 比较合适。

3.6 整合微生物组菌剂生产工艺和质量标准初步确定

整合微生物组菌剂生产工艺,利用养猪使用 1 年以上的微生物发酵床,添加一层 10 cm 厚的 30% 豆饼粉+70%杏鲍菇菌糠垫料,进行二次固体好氧发酵,每天翻耕 1 次,连续好氧发酵 20 d 后,取出上层 20 cm 的垫料,进入晾晒、粉碎、分筛、包装,加工成整合微生物组菌剂。生产工艺为:原料配置→发酵床发酵→好氧发酵控制→产品加工→产品包装等。整合微生物组菌剂的质量标准参考农业农村部生物有机肥农业行业标准(NY884-2012),产品技术指标初步确定为:有机质 $\geq 40\%$,含水量 $\leq 30\%$, pH 5.5—7.5,粪大肠菌群数 ≤ 100 个/g,蛔虫卵死亡率 $> 95\%$,有效期 > 6 个月;重金属含量满足标准要求:砷 $< 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,镉 $\leq 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,铅 $\leq 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,铬 $\leq 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,汞 $\leq 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;有效活菌数调整为:细菌微生物组 $\geq 30 \times 10^8 \text{ cfu/g}$ (实际含量高得多,用于缓冲产品保存期含菌量的衰减),其中芽孢杆菌 $\geq 2 \times 10^8 \text{ cfu/g}$ 。

4 结 论

提出了整合微生物组菌剂的概念,建立了猪粪氮素连续流加和中温好氧发酵技术的生产工艺;提出产品技术指标,与农业农村部生物有机肥的质量标准接轨,重金属含量满足标准要求,芽孢杆菌有效活菌数 $\geq 2 \times 10^8 \text{ cfu/g}$ 。生产出的整合微生物菌剂不影响种子发芽,能促进根部生长,并对根部病害(番茄青枯病)有良好的防治效果。

References

[1] 曹怡,王超群,徐风,贾秀虹,刘广学,杨生超,龙光强,陈中坚,魏富刚,杨绍周,福田浩三,王璇,蔡少青. 中药三七质量评价半微量方法及在三七连作障碍样品分析中的应用. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3773-3781.
CAO Y, WANG C Q, XU F, JIA X H, LIU G X, YANG S C, LONG G Q, CHEN Z J, WEI F G, YANG S Z, FUKUDA K, WANG X, CAI S

Q. A semimicroquality evaluation method on *Panax notoginseng* and its application in analysis of continuous cropping obstacles research samples. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(20): 3773-3781. (in Chinese)
[2] QIN S, YEBOAH S, CAO L, ZHANG J, SHI S, LIU Y. Breaking continuous potato cropping with legumes improves soil microbial communities, enzyme activities and tuber yield. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0175934.
[3] CHELLEMI D O, ROSSKOPF E N, KOKALIS-BURELLE N. The effect of transitional organic production practices on soilborne pests of tomato in a simulated microplot study. *Phytopathology*, 2013, 103(8): 792-801.
[4] 肖春萍,杨利民,马锋敏. 栽培年限对人参根际土壤微生物活性及微生物量的影响. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4740-4747.
XIAO C P, YANG L M, MA F M. Effects of growing time on *Panax ginseng* rhizosphere soil microbial activity and biomass. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(24): 4740-4747. (in Chinese)
[5] LUAN F G, ZHANG L L, LOU Y Y, WANG L, LIU Y N, ZHANG H Y. Analysis of microbial diversity and niche in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton at the flowering stage in southern Xinjiang. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1602-1611.
[6] 茹瑞红,李烜桢,黄晓书,高峰,王建明,李本银,张重义. 食用菌菌渣缓解地黄连作障碍的研究. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3036-3041.
RU R H, LI X Z, HUNAG X S, GAO F, WANG J M, LI B Y, ZHANG Z Y. Effect of substrate of edible mushroom on continuously cropping obstacle of *Rehmannia glutinosa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(16): 3036-3041. (in Chinese)
[7] 张重义,李改玲,牛苗苗,范华敏,李娟,林文雄. 连作地黄的生理生态响应与品质评价. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1133-1136.
ZHANG Z Y, LI G L, NIU M M, FAN H M, LI J, LIN W X. Responses of physiological ecology and quality evaluation of *Rehmannia gltinosa* in continuous cropping. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(9): 1133-1136. (in Chinese)
[8] 尹文佳,杜家方,李娟,张重义. 连作对地黄生长的障碍效应及机制研究. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 18-21.
YIN W J, DU J F, LI J, ZHANG Z Y. Effects of continuous cropping obstacle on growth of *Rehmannia glutinosa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(1): 18-21. (in Chinese)
[9] 吴凤芝,李敏,曹鹏,马亚飞,王丽丽. 小麦根系分泌物对黄瓜生长及土壤真菌群落结构的影响. 应用生态学报, 2014, 25(10): 2861-2867.

- WU F Z, LI M, CAO P, MA Y F, WANG L L. Effects of wheat root exudates on cucumber growth and soil fungal community structure. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(10): 2861-2867. (in Chinese)
- [10] 赵娟, 薛泉宏, 杜军志, 陈姣姣. 两株镰孢菌的鉴定及其粗毒素对甜瓜幼苗的化感作用. *应用生态学报*, 2013, 24(1): 142-148.
- ZHAO J, XUE Q H, DU J Z, CHEN J J. Identification of two *Fusarium* isolates and their crude toxin allelopathic effect on *Cucumis melo* seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(1): 142-148. (in Chinese)
- [11] 陈可, 孙吉庆, 刘润进, 李敏. 丛枝菌根真菌对西瓜嫁接苗生长和根系防御性酶活性的影响. *应用生态学报*, 2013, 24(1): 135-141.
- CHEN K, SUN J Q, LIU R J, LI M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on the seedling growth of grafted watermelon and the defensive enzyme activities in the seedling roots. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(1): 135-141. (in Chinese)
- [12] 孟品品, 刘星, 邱慧珍, 张文明, 张春红, 王蒂, 张俊莲, 沈其荣. 连作马铃薯根际土壤真菌种群结构及其生物效应. *应用生态学报*, 2012, 23(11): 3079-3086.
- MENG P P, LIU X, QIU H Z, ZHANG W M, ZHANG C H, WANG D, ZHANG J L, SHEN Q R. Fungal population structure and its biological effect in rhizosphere soil of continuously cropped potato. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(11): 3079-3086. (in Chinese)
- [13] 张新慧, 张恩和, 王惠珍, 郎多勇. 连作对当归生长的障碍效应及机制研究. *中国中药杂志*, 2010, 35(10): 1231-1234.
- ZHANG X H, ZHANG E H, WANG H Z, LANG D Y. Effects of continuous cropping obstacle on growth of *Angelica sinensis* and its mechanism. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(10): 1231-1234. (in Chinese)
- [14] ZHANG X, LI X, ZHANG C, LI X, ZHANG H. Ecological risk of long-term chlorimuron-ethyl application to soil microbial community: an in situ investigation in a continuously cropped soybean field in Northeast China. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(3): 407-415.
- [15] 银福军, 瞿显友, 曾伟, 舒抒. 黄连不同部位水浸液自毒作用研究. *中药材*, 2009, 32(3): 329-330.
- YIN F J, QU X Y, ZENG W, SHU S. Study on the autointoxication of aquatic extracts from different parts of *Coptis chinensis*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2009, 32(3): 329-330. (in Chinese)
- [16] 张淑香, 高子勤. 连作障碍与根际微生态研究 II. 根系分泌物与酚酸物质. *应用生态学报*, 2000, 11(1): 152-156.
- ZHANG S X, GAO Z Q. Continuous cropping obstacle and rhizospheric microecology. II. Root exudates and phenolic acids. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(1): 152-156. (in Chinese)
- [17] LI T, LIU T, ZHENG C, KANG C, YANG Z, YAO X, SONG F, ZHANG R, WANG X, XU N, ZHANG C, LI W, LI S. Changes in soil bacterial community structure as a result of incorporation of *Brassica* plants compared with continuous planting eggplant and chemical disinfection in greenhouses. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0173923.
- [18] YANG H, LI J, XIAO Y, GU Y, LIU H, LIANG Y, LIU X, HU J, MENG D, YIN H. An integrated insight into the relationship between soil microbial community and tobacco bacterial wilt disease. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2179.
- [19] NOVELLO G, GAMALERO E, BONA E, BOATTI L, MIGNONE F, MASSA N, CESARO P, LINGUA G, BERTA G. The rhizosphere bacterial microbiota of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir in an integrated pest management vineyard. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1528.
- [20] KALIVAS A, GANOPOULOS I, PSOMOPOULOS F, GRIGORIADIS I, XANTHOPOULOU A, HATZIGIANNAKIS E, OSATHANUNKUL M, TSAFTARIS A, MADEISIS P. Comparative metagenomics reveals alterations in the soil bacterial community driven by N-fertilizer and amino 16® application in lettuce. *Genomics Data*, 2017, 14: 14-17.
- [21] SHIVAJI S, CHATURVEDI P, SURESH K, REDDY G S, DUTT C B, WAINWRIGHT M, NARLIKAR J V, BHARGAVA P M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(7): 1465-1473.
- [22] HONG S W, PARK J M, KIM S J, CHUNG K S. *Bacillus eiseniae* sp. nov., a swarming, moderately halotolerant bacterium isolated from the intestinal tract of an earthworm (*Eisenia fetida* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(9): 2077-2083.
- [23] SONALKAR V V, MAWLANKAR R, VENKATA RAMANA V, JOSEPH N, SHOUCHE Y S, DASTAGER S G. *Bacillus filamentosus* sp. nov., isolated from sediment sample. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(2): 433-441.
- [24] SEILER H, SCHMIDT V, WENNING M, SCHERER S. *Bacillus kochii* sp. nov., isolated from foods and a pharmaceuticals manufacturing

- site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(5): 1092-1097.
- [25] MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, LEE J S, LEE K C, HARI K. *Bacillus rhizosphaerae* sp. nov., an novel diazotrophic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 100(3): 437-444.
- [26] COOREVITS A, DINSDALE A E, HEYRMAN J, SCHUMANN P, VAN LANDSCHOOT A, LOGAN NA, DE VOS P. *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(5): 1121-1127.
- [27] NAM J H, BAE W, LEE D H. *Oceanobacillus caeni* sp. nov., isolated from a *Bacillus*-dominated wastewater treatment system in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(5): 1109-1113.
- [28] SHIN N R, WHON T W, KIM M S, ROH S W, JUNG M J, KIM Y O, BAE J W. *Ornithinibacillus scapharcae* sp. nov., isolated from a dead ark clam. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 101(1): 147-154.
- [29] YIN X, YANG Y, WANG S, ZHANG G. *Virgibacillus oceani* sp. nov. isolated from ocean sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(1): 159-164.
- [30] CARRASCO I J, MÁRQUEZ M C, VENTOSA A. *Virgibacillus salinus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from sediment of a saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(12): 3068-3073.
- [31] CHEN Y G, GU F L, LI J H, XU F, HE S Z, FANG Y M. *Bacillus vanillea* sp. nov., isolated from the cured vanilla bean. *Current Microbiology*, 2015, 70(2): 235-239.
- [32] HOOPER L V, GORDON J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 2001, 292(5519): 1115-1118.
- [33] KALLMEYER J, POCKALNY R, ADHIKARI R R, SMITH D C, D'HONDT S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16213-16216.
- [34] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS J M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganism. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 634-663.
- [35] 李静, 李荣, 沈其荣, 俞萍, 余光辉. 添加动物源氨基酸水解液研制生物有机肥. *环境科学研究*, 2017, 30(6): 967-973.
- LI J, LI R, SHEN Q R, YU P, YU G H. Development of bio-organic fertilizer by adding amino acids hydrolyzed from animal carcasses. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(6): 967-973. (in Chinese)
- [36] 陈智毅, 赵晓丽, 刘学铭. 金针菇菌糠堆肥生产有机肥研究. *中国食用菌*, 2012, 31(4): 30-31.
- CHEN Z Y, ZHAO X L, LIU X M. Study on composting of organic fertilizer produced by spent mushroom substrate from *Flammulina velutipes*. *Edible Fungi of China*, 2012, 31(4): 30-31. (in Chinese)
- [37] 张志红, 李华兴, 冯宏, 赵兰凤, 李敏清, 胡伟. 堆肥作为微生物菌剂载体的研究. *农业环境科学学报*, 2010, 29(7): 1382-1387.
- ZHANG Z H, LI H X, FENG H, ZHAO L F, LI M Q, HU W. Compost as a carrier for microbial inoculants. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(7): 1382-1387. (in Chinese)
- [38] 李季. 堆肥发酵接种剂及规模化生物有机肥产业化. *中国科技奖励*, 2008(10): 21.
- LI J. Composting fermentation inoculant and industrialization of large-scale bio-organic fertilizer. *China Awards for Science and Technology*, 2008(10): 21. (in Chinese)
- [39] 张发宝, 徐培智, 唐拴虎, 陈建生, 谢开治, 黄旭. 畜禽粪好氧堆肥产品的理化性质及生物效应. *广东农业科学*, 2008(5): 54-57.
- ZHANG F B, XU P Z, TANG S H, CHEN J S, XIE K Z, HUANG X. Physicochemical properties and biological effects of aerobically composted livestock manure products. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2008(5): 54-57. (in Chinese)
- [40] 田旸, 柳丽芬, 张兴文, 杨凤林, 谭伟杰. 秸秆与污泥混合堆肥研究. *大连理工大学学报*, 2003, 43(6): 753-758.
- TIAN Y, LIU L F, ZHANG X W, YANG F L, TAN W J. Study of co-composting of sewage sludge and straw biomass. *Journal of Dalian University of Technology*, 2003, 43(6): 753-758. (in Chinese)
- [41] 扎史品楚, 农传江, 王宇蕴, 徐智. 生物有机肥的发酵工艺及应用效果研究. *环境工程*, 2015, 33(增刊): 1011-1014, 1020.
- ZHASHIPC, NONG C J, WANG Y Y, XU Z. Research of microbial organic fertilizer fermentation process and its application. *Environmental Engineering*, 2015, 33(Suppl.): 1011-1014, 1020. (in Chinese)
- [42] 陈谦, 张新雄, 赵海, 官家发. 生物有机肥中几种功能微生物的研究及应用概况. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(2): 294-300.
- CHEN Q, ZHANG X X, ZHAO H, GUAN J F. Advance in research and application of some functional microbes in bio-organic fertilizer.

- Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(2): 294-300. (in Chinese)
- [43] 张毅民, 万先凯. 微生物菌群在生物有机肥制备中研究进展. 化学工业与工程, 2003, 20(6): 523-527.
- ZHANG Y M, WAN X K. Progress of microorganisms in bioorganic fertilizer production. *Chemical Industry and Engineering*, 2003, 20(6): 523-527. (in Chinese)
- [44] 陈倩倩, 刘波, 王阶平, 刘国红, 车建美, 陈峥, 唐建阳. 微生物发酵床猪舍不同发酵等级垫料中大肠杆菌的分离鉴定. 中国畜牧兽医, 2017, 44(1): 268-274.
- CHEN Q Q, LIU B, WANG J P, LIU G H, CHE J M, CHEN Z, TANG J Y. Isolation and identification of *E. coli* in the microbial-fermentation bed of piggery. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 44(1): 268-274. (in Chinese)
- [45] 陈星言, 邵镜颐, 吕建洲. 龙血竭制剂对绿豆种子萌发和幼苗生长的影响. 园艺与种苗, 2016(7): 86-88.
- CHEN X Y, SHAO J Y, LÜ J Z. Effect of *Resina draconis* on germination and seedling growth of mung bean. *Horticulture and Seed*, 2016(7): 86-88. (in Chinese)
- [46] 俞家楠, 刘照斌, 吕建洲. 肌苷对绿豆种子萌发和幼苗生长的影响. 中国农学通报, 2015, 31(17): 53-57.
- YU J N, LIU Z B, LÜ J Z. Effects of inosine on seed germination and seedling growth of mung bean. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(17): 53-57. (in Chinese)
- [47] 邢亚亮, 成月娇. 青霉素对绿豆发芽及幼苗生长的影响. 农业技术与装备, 2013(7): 66-68.
- XING Y L, CHENG Y J. Effects of penicillin on seed germination and seedling growth of mung bean. *Agricultural Technology and Equipment*, 2013(7): 66-68. (in Chinese)
- [48] 高小宽, 魏淑珍. 根际微生物对绿豆发芽率的影响. 江苏农业科学, 2010(1): 106-108.
- GAO X K, WEI S Z. Effects of rhizospheric microorganism on seed germination of mung bean. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(1): 106-108. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)



原料配制 Raw material preparation



原料混合 Raw material blending



原料添加 Add ingredients



发酵翻耕 Fermentation ploughing



发酵产品 Fermented product



产品粉碎 Product breaking



产品过筛 Product sieving



产品包装 Product packaging



菌剂产品 Bacteria agent products



发酵前原料 Prefermentation material

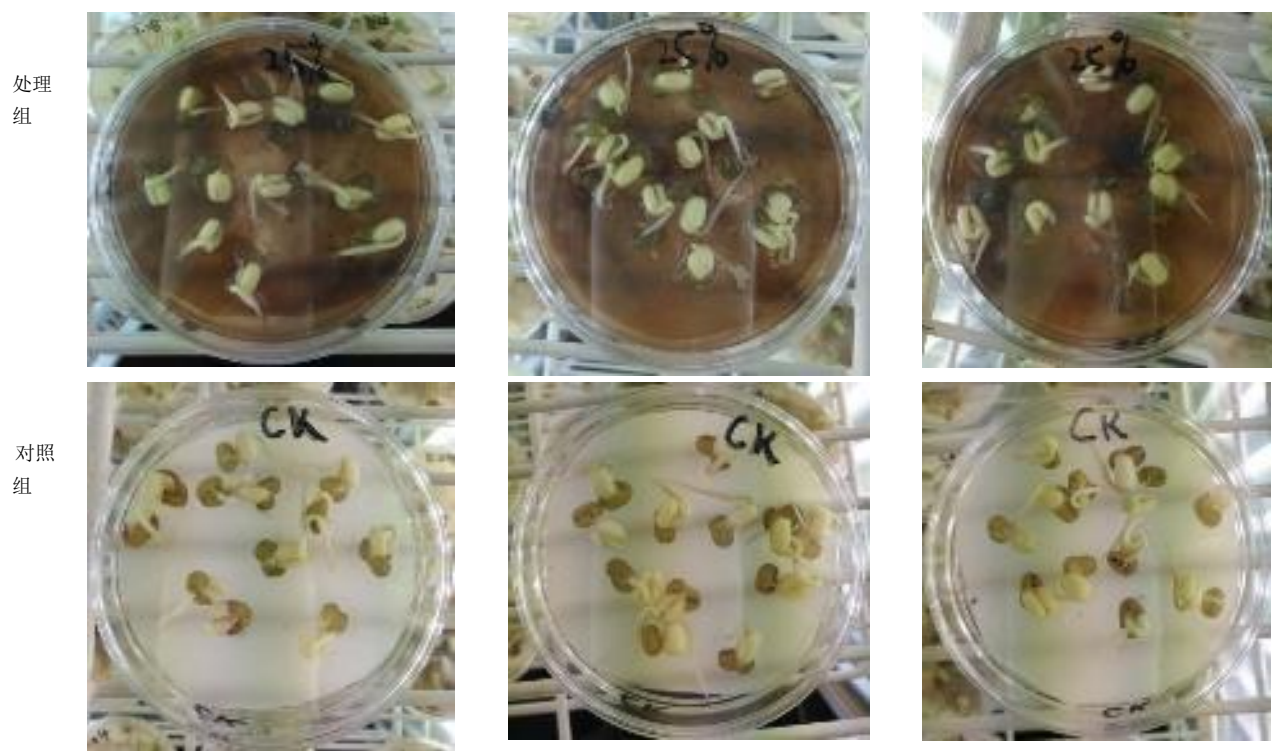


发酵后产物 Postfermentation product



加工后产品 Post-processing product

附图1 整合微生物组菌剂加工过程
Fig. S1 Process of the integrated microbiome agent



附图 2 整合微生物组菌剂对绿豆发芽和根长影响照片 (24 h)

Fig. S2 Photos for effect of the integrated microbiome agent on germination and root growth of mung bean (24 h)