

DOI:10.11686/cyxb2021197

http://cyxb.magtech.com.cn

戈建珍, 傅文慧, 张露, 等. 多菌灵在果园白三叶青贮中的降解及其对微生物群落的影响. 草业学报, 2022, 31(7): 64—75.

GE Jian-zhen, FU Wen-hui, ZHANG Lu, *et al.* Degradation of carbendazim in orchard white clover silage and its effect on the microbial fermentative community. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(7): 64—75.

多菌灵在果园白三叶青贮中的降解 及其对微生物群落的影响

戈建珍, 傅文慧, 张露, 蔺宝珺, 赵帅, 白玛噶翁, 寇建村*

(西北农林科技大学草业与草原学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了解白三叶青贮后不同浓度多菌灵农药的降解情况和果园喷施多菌灵对白三叶青贮过程中细菌多样性的影响, 扩大具有农药残留的果园覆盖植物利用途径, 在喷施不同浓度[2.0 (RU⁻), 2.5 (RU), 3.0 g·L⁻¹ (RU⁺)]的多菌灵后进行白三叶青贮, 以喷水为对照, 发酵60 d。采用 Miseq 高通量测序技术, 分别在青贮开始前、青贮第3和60天取样, 对白三叶中细菌群落多样性进行研究。结果表明, 青贮后多菌灵降解率达到59.6%以上, 喷施量越高, 降解率越高; 多菌灵处理显著($P < 0.05$)增加了白三叶青贮发酵的乳酸、乙酸、丙酸含量, 乳酸在多菌灵 RU⁻、RU、RU⁺ 浓度下分别增加了47.55%、63.24%、71.08%, 乙酸分别增加了24.49%、44.90%、46.94%, 丙酸分别增加了66.67%、187.50%、250.00%, 有利于白三叶青贮饲料营养成分的保留; 多菌灵喷施显著($P < 0.05$)改变了白三叶青贮菌群群落构成, 增加了青贮的菌群丰度、多样性; 多菌灵处理中乳球菌属、魏斯氏菌属、泛菌属、*Rosenbergiella*、假单胞菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属菌群丰度增加, 不利于青贮发酵, 但随着青贮时间的推移, 寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属等菌群丰度减少。喷施多菌灵后有利于青贮发酵微生物菌群的丰度增加, 对青贮发酵有害菌、多菌灵降解菌群丰度及青贮微生物多样性产生影响, 青贮后多菌灵残留高于欧洲食品安全局规定的作物类动物饲料中农药最大残留量, 达不到饲用标准。研究结果可为具有农药残留的白三叶青贮饲料的饲用安全性和果园覆盖植物资源的开发利用提供理论依据。

关键词: 多菌灵; 还原降解; 微生物群落; 白三叶; 青贮品质

Degradation of carbendazim in orchard white clover silage and its effect on the microbial fermentative community

GE Jian-zhen, FU Wen-hui, ZHANG Lu, LIN Bao-jun, ZHAO Shuai, BAI Ma-ga-weng, KOU Jian-cun*

College of Grassland Agriculture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: This research investigated the degradation of carbendazim fungicide residues in white clover (*Trifolium repens*) silage cut within an orchard and the effect of carbendazim residues on the diversity of the fermentative microbial community, to explore options for the use of cover plants with pesticide residues in orchards. Different carbendazim concentrations (2.0, 2.5, 3.0 g·L⁻¹, with a water spray as Control) were sprayed on white clover prior to ensiling. The silage was harvested after 60 days fermentation at room temperature. Samples were taken before ensiling, on the 3rd day and on the 60th day after ensiling to study the diversity and composition of the microbial fermentative community using Miseq high-throughput sequencing technology. The degradation rate of

收稿日期: 2021-05-11; 改回日期: 2021-08-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0501905)和西安市科技计划项目(20NYFF0030)资助。

作者简介: 戈建珍(1995-), 男, 河北尚义人, 在读硕士。E-mail: 1056315820@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jiancun02@163.com

carbendazim during was found to be up to 59.6%, and the higher the application rate, the higher the degradation rate. Carbendazim treatment significantly increased the content of lactic acid, acetic acid, and propionic acid in white clover silage during fermentation. For days 0, 3 and 60 of ensiling, lactic acid increased by 47.55%, 63.24%, 71.08%, respectively; acetic acid increased by 24.49%, 44.90%, 46.94%, respectively, and propionic acid increased by 66.67%, 187.50%, and 250.00%, respectively. These changes enhanced the retention of nutrients in the clover silage. High-throughput sequencing results showed that spraying carbendazim significantly changed the composition of white clover silage bacterial community and increased the abundance and diversity of the silage flora. After spraying carbendazim, the abundance of *Lactococcus*, *Weissella*, *Pantoea*, *Rosenbergiella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, and *Bacillus* increased and these changes not conducive to good silage fermentation. However, with the passage of time after ensiling, the abundance of *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* and other flora decreased. In summary, carbendazim pesticide increased the number of microorganisms beneficial to silage fermentation, and altered the abundance of bacteria harmful to silage fermentation. Carbendazim spraying also increased the diversity of carbendazim-degrading bacteria and the silage microorganisms. The residual amounts of carbendazim in silage were higher than the maximum residue of this fungicide stipulated for feed crops by the European Food Safety Agency and hence the silage did not meet the feed standards. These results provide test data on the level of carbendazim residues remaining in herbage after ensiling following spraying and will assist in the development of safe practices for the use of orchard cover plants.

Key words: carbendazim; carbendazim degradation; microbial fermentative community; white clover; silage quality

果园生草是草本植物与果树协调共生的生态果园地面管理模式,作为现代果园土壤管理先进技术,近年来大量研究表明果园生草在农业生态系统中具有十分重要的作用^[1-3]。随着现代果园生草种植在我国快速发展,果园生草资源利用得到广泛的关注,研究主要集中在果园生草刈割后返园或堆肥^[4-5]。但果园生草不及时刈割,或直接返园后易引发病虫害^[6],果园白三叶(*Trifolium repens*)刈割后通过埋置或覆盖的方式返园,其降解速度较慢,需时较长^[7]。因此,高效科学地利用这些物质资源具有重要意义,而将果园覆盖白三叶作为动物饲料来利用是一种重要的途径。果园生草是重要的饲料来源,由于果树管理过程中大量使用农药,使得果园覆盖植物作为饲料有很大的健康风险。因此,采用科学有效的方法降低果园覆盖植物白三叶上的农药残留,将其作为动物饲料来利用具有重要的意义。

多菌灵广泛应用于果园生产中的病害防治,能有效防治由真菌(如多子囊菌、半知菌)引起的病害,但也是一种典型的降解缓慢、水溶性低、持久性强的有机污染物^[8],因其结构稳定性较高,半衰期较长以及不科学合理地使用,导致土壤环境、动物饲草料和动物源食品中多菌灵农药残留含量较高^[9]。青贮可以降解多种农药,青贮微生物在饲料发酵过程中起着决定性的作用,是饲草调制成高品质青贮饲料的关键,对青贮过程中原料营养成分的保留^[10]、pH的降低^[11]、青贮有害菌的抑制^[12]、青贮饲料有氧稳定性^[13]以及污染物降解转化^[14]等有重要意义。发酵过程中微生物对化学物品的生物降解是许多有机化合物分解的最重要机制之一^[15]。同时,青贮微生物多样性及其代谢产物也反映了青贮饲料发酵的基本状况^[16]。而多菌灵作为杀菌剂,在青贮发酵过程中能否对青贮微生物产生一定的影响,进而影响青贮发酵的品质,尚未报道。

目前,关于多菌灵农药与微生物关系的研究主要集中在土壤中多菌灵降解菌的筛选^[17]、多菌灵降解的微生物群落^[18],以及多菌灵对土壤微生物的毒性^[19]等方面。关于青贮发酵对多菌灵农药的降解及其对青贮发酵过程中微生物群落的影响研究甚少。本研究以黄土高原优势果园草—白三叶为材料,喷施不同浓度多菌灵为处理,在青贮60 d后对多菌灵残留、乳酸、乙酸、丙酸、pH、氨态氮、干物质、粗蛋白和粗纤维等一系列指标进行了检测,同时,测定了青贮发酵关键期(0, 3, 60 d)的微生物群落。旨在研究青贮发酵条件下,不同浓度多菌灵的降解情况及其

对微生物群落的影响,为果园覆盖植物资源作为青贮饲料利用的安全性以及为种养结合、“林—草—畜”可持续发展循环农业模式提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

白三叶采自陕西省咸阳市杨陵区现代农业创新园苹果试验基地(108°02' E, 34°18' N)。试验区苹果园年平均气温 12.9 °C,无霜期 211 d,年平均降水量 635.1 mm,年均日照时数 2163 h,年总太阳辐射量 480.90 kJ·cm⁻²,日照充足,昼夜温差大。苹果园占地 5.3 hm²,土壤为黑垆土。试验区种植果树品种为“长富2号”,果树行间距 4 m,株间距 2 m,行间种植白三叶。

1.2 青贮前处理

由于缺乏适当的监督和监管,多菌灵农药的使用量远超出建议施用的水平^[20],所以本试验用 2.0 (RU⁻)、2.5 (RU)、3.0 g·L⁻¹ (RU⁺)多菌灵对处于盛花期白三叶进行农药喷施,喷施等量水作为对照(CON),待各组叶面所喷液体自然挥发后,割取白三叶放到无菌袋中,迅速带回实验室,将所取材料切至 2~3 cm 长,添加 2% 蔗糖(20 g)混合均匀后,装入 1 L 青贮罐中,每瓶约 800 g,压实后密封,重复 3 次,放置到室温下青贮,用于检测农药残留及营养指标的测定。对喷施 3 g·L⁻¹多菌灵处理进行微生物群落测定,在青贮当天(0 d)取样标记为 A 组;第 3 天取样,不喷多菌灵记为 B 组,喷施多菌灵记为 C 组;第 60 天开罐取样,喷多菌灵记为 D 组,不喷施多菌灵记为 E 组,3 次重复,用 16S MetaVxTM方法检测各处理中主要微生物菌群在青贮过程中的群落动态变化。

1.3 青贮后取样

白三叶青贮 60 d 时,从瓶中取出青贮饲料、混匀,称 20 g,加 180 mL 蒸馏水,搅拌均匀,用封口膜封口,于 4 °C 静置 24 h,四层纱布过滤,再用漏斗过滤,用于 pH、有机酸、可溶性糖(water soluble carbohydrates, WSC)及氨态氮的测定;取样 150 g 于 65 °C 烘箱烘至恒重后粉碎,用于测定干物质(dry matter, DM),粗蛋白(crude protein, CP),粗纤维(crude fiber, CF),酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF),中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF),含水量。在青贮第 0, 3, 60 天开罐取样,用超纯水浸泡并不断搅拌,用细菌滤膜过滤,全程在无菌条件下进行,在 -80 °C 冰箱保存用于测定微生物群落。

1.4 测试及分析

通过梅特勒—利多 DELTA320 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司,上海)测定 pH,通过高效液相色谱法测定青贮饲料中的有机酸含量,采用苯酚—次氯酸钠比色法测定氨态氮含量,采用蒽酮—硫酸比色法测定可溶性碳水化合物含量,通过凯氏定氮法测定青贮饲料的粗蛋白含量,酸碱消煮法、中性洗涤剂法、酸性洗涤剂法测定青贮饲料粗纤维、ADF、NDF 含量,烘干法测定干物质含量,用残余法(SOX406 脂肪测定仪)测定粗脂肪含量,进行青贮后化学成分分析^[21],采用液相色谱—串联质谱法测定多菌灵农药残留量^[22]。高通量测序文库构建和 Illumina MiSeq 测序是由 GENEWIZ 公司(中国苏州)使用 MetaVxTM文库构建试剂盒(GENEWIZ, 南平原, 新泽西州, 美国)来构建测序文库。采用包含“CCTACGGRBGCASCAGKVRVGAAT”序列的上游引物和包含“GGACTACNVGGGTWTCTAATCC”序列的下游引物扩增 V3 和 V4 区。另外,通过 PCR 向 16S rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头,以便进行高通量测序(next generation sequencing, NGS)测序。

1.5 数据处理

用 SPSS 22 和 Microsoft Office Excel 2010 软件对数据进行处理,单因素方差分析采用 One-way ANOVA,采用 Duncan 平均值多重比较分析法对农药降解率、品质指标等数据进行分析。对原始数据进行去接头和低质量过滤处理,然后去除嵌合体序列,得到有效序列后进行聚类分析,每一个聚类称为一个物种操作单元(operational taxonomic units, OTU),对 OTU 的代表序列作分类学分析,得到各样本的物种分布信息。基于 OTU 分析结果,对各个样本进行多种 α 多样性指数分析,得到各样本物种丰富度和均匀度等信息;基于分类学信息,在各个分类水平上进行群落结构的统计分析;通过计算 Unifrac 距离、构建 UPGMA 样本聚类树、绘制 PCoA 图等,直观展示不同样本或分组之间群落结构差异。

2 结果与分析

2.1 不同浓度多菌灵对白三叶青贮品质及其营养成分的影响

本研究中,没有检测到丁酸,与对照相比,不同浓度多菌灵处理均显著提高了白三叶青贮发酵乳酸、乙酸、丙酸的含量($P<0.05$),乳酸在多菌灵 RU^- 、 RU 、 RU^+ 浓度下分别增加了 47.55%、63.24%、71.08%,乙酸分别增加了 24.49%、44.90%、46.94%,丙酸分别增加了 66.67%、187.50%、250.00%,并随着多菌灵喷施浓度的增加而增加。在 RU^+ 浓度下乳酸、乙酸、丙酸含量最高,pH 的变化与乳酸、乙酸、丙酸含量变化趋势相吻合,随着有机酸的增加 pH 值减小(表 1)。

喷施多菌灵的白三叶青贮 60 d 后的 DM 含量表现为 RU 、 RU^+ 处理显著低于对照, RU^- 处理低于对照,但差异不显著($P>0.05$)。不同浓度处理的 CP 含量均显著高于对照($P<0.05$),表现为 $RU^+>RU>RU^->$ 对照。氨态氮含量与 CP 含量变化趋势相反, RU^- 、 RU^+ 处理下氨态氮含量均显著低于对照($P<0.05$)。CF 表现为 RU^+ 处理显著高于对照。在不同浓度多菌灵处理下,ADF、NDF 含量均高于对照;ADF 含量随着农药浓度的增加先增后减,在 RU 处理下含量最高;NDF 含量随着农药浓度的增加逐渐减小,喷施多菌灵对白三叶青贮粗脂肪无显著影响。

表 1 多菌灵对果园白三叶青贮饲料品质及营养价值的影响

Table 1 Effect of carbendazim on the quality and nutritional value of white clover silage in orchard

| 项目 Item | 空白对照 CON | RU^- | RU | RU^+ | 标准误 SEM | P-value |
|---|-------------|-------------|--------------|--------------|---------|---------|
| 乳酸 Lactic acid ($mg\cdot mL^{-1}$) | 2.04±0.09c | 3.01±0.20b | 3.33±0.11a | 3.49±0.10a | 0.172 | 0.017 |
| 乙酸 Acetic acid ($mg\cdot mL^{-1}$) | 0.49±0.05c | 0.61±0.04b | 0.71±0.06a | 0.72±0.04a | 0.738 | 0.030 |
| 丙酸 Propionic acid ($mg\cdot mL^{-1}$) | 0.24±0.04c | 0.40±0.06b | 0.69±0.49b | 0.84±0.45a | 0.101 | 0.049 |
| pH | 4.92±0.06a | 4.65±0.04b | 4.53±0.03c | 4.62±0.04b | 0.706 | 0.044 |
| 氨态氮 NH_3-N ($g\cdot kg^{-1}$) | 2.86±0.13a | 2.23±0.13c | 2.60±0.23ab | 2.42±0.19bc | 0.082 | 0.031 |
| 干物质 DM ($g\cdot kg^{-1}$) | 45.84±0.21a | 45.73±0.15a | 43.45±0.11c | 44.22±0.21b | 0.309 | 0.032 |
| 粗蛋白 CP ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 18.36±0.21c | 19.22±0.19a | 18.79±0.16b | 19.27±0.15a | 0.119 | 0.032 |
| 粗纤维 CF ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 17.00±0.20b | 16.97±0.15b | 17.23±0.15ab | 17.37±0.15a | 0.065 | 0.027 |
| 酸性洗涤纤维 ADF ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 24.63±0.12c | 25.07±0.12b | 26.10±0.20a | 24.77±0.21bc | 0.162 | 0.028 |
| 中性洗涤纤维 NDF ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 24.43±0.15c | 25.93±0.21a | 25.00±0.17b | 24.53±0.15c | 0.157 | 0.030 |
| 可溶性碳水化合物 WSC ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 2.48±0.09b | 3.80±0.01a | 3.83±0.02a | 3.88±0.02a | 0.178 | 0.002 |
| 粗脂肪 EE ($g\ DM\cdot kg^{-1}$) | 3.51±0.08a | 3.56±1.00a | 3.69±0.61a | 3.46±0.18a | 0.055 | 0.067 |

注:数据是平均值±标准差($n=3$)。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Data are means±standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences at $P<0.05$. CON: Blank control; DM: Dry matter; CP: Crude protein; ADF: Acid detergent fiber; NDF: Neutral detergent fiber; WSC: Water soluble carbohydrates; EE: Ether extract.

2.2 白三叶青贮发酵后不同浓度多菌灵的降解

为了确定青贮后不同浓度多菌灵农药的降解程度,在实验室进行了模拟筒仓青贮发酵的试验。将含有初始浓度为 37.52,46.88,56.28 $mg\cdot kg^{-1}$ 多菌灵的白三叶进行青贮发酵,在发酵后,多菌灵降解情况如图 1 所示。可以看出, RU^- 浓度多菌灵处理下经过 60 d 青贮发酵后多菌灵残留为 15.15 $mg\cdot kg^{-1}$, RU 处理浓度下多菌灵残留浓度为 16.30 $mg\cdot kg^{-1}$ 、 RU^+ 处理为 16.50 $mg\cdot kg^{-1}$ 。3 个处理浓度下(RU^- 、 RU 、 RU^+)多菌灵的降解率分别为 59.62%、65.23%、70.68%,并随着多菌灵浓度的增加降解率逐渐增加。

2.3 果园生草白三叶青贮过程中微生物群落动态变化

2.3.1 序列数据预处理及微生物群落结构多样性分析 分别取青贮第 0,3,60 天的青贮样品 DNA,用 16S MetaVx™方法检测各处理中主要微生物菌群在青贮过程中的群落动态变化。为了得到更高质量及更准确的生物信息分析结果,对测序原始数据进行优化处理。本试验中的 5 个样品共获得了 337551 条有效序列,经过优化选

择了301819条去除嵌合体后有效序列,平均每个样品约60364条序列。在97%的序列相似性标准下,共得到了433个OTUs,分属于5个门,6个纲,17个目(表2),A、B、C、D和E组分别有2、0、2、1和1个独特的OTU(图2)。

2.3.2 微生物群落 α 多样性分析 在本研究中,用Chao 1指数显示菌群丰富度(community richness)(图3a),用Shannon指数显示菌群多样性(community diversity)(图3b)。结果表明,青贮3、60 d时菌群丰度、多样性均高于0 d,青贮3 d时喷施多菌灵处理组(C)菌群丰度、多样性均高于不喷多菌灵处理组(B),青贮60 d时喷施多菌灵处理组(D)菌群丰度与不喷多菌灵处理组(E)无差异,喷施多菌灵处理组菌群多样性显著高于不喷多菌灵处理组。添加多菌灵白三叶青贮60 d与3 d相比,菌群丰度表现为 $C>D$ 、多样性表现为 $C<D$ 。

2.3.3 喷施多菌灵的白三叶青贮发酵过程中菌群结构分析 图4中PC1、PC2和PC3轴分别可以解释46.73%、24.87%和13.44%的微生物群落结构差异,3个主成分累计解释了样品中细菌群落组成变化的85.04%。5个不同处理青贮样品点分布较为分散,说明各处理间微生物群落构成存在差异。青贮3 d时,喷施多菌灵处理组(C)与不喷多菌灵处理组(B)样本点距离较远,说明微生物群落结构差异较大。随着时间的推移,在青贮60 d时,喷施多菌灵处理组(D)与不喷多菌灵处理组(E)样本点距离出现显著聚合现象,说明微生物群落结构差异减小。

在不同的分类水平上分析了多菌灵对白三叶青贮中细菌的群落组成和结构的影响(图5)。青贮细菌菌群门水平分布包括4个门(phylum),主要由拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)组成。5个处理组中变形菌门、厚壁菌门占比较多,青贮3 d时,B与C组相比,多菌灵的喷施减少了厚壁菌门的相对丰度,增加了变形菌门的相对丰度。青贮60 d时,D与E组相比,菌群丰度变化与青贮3 d时变化趋势一致。青贮60 d与3 d相比,喷施多菌灵处理主要菌群表现为变形菌门丰度增加,厚壁菌门丰度减少。

青贮细菌菌群科水平分布包括28个科(family),包括乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、明串珠菌科(Leuconostocaceae)、链球菌科(Streptococcaceae)、肠

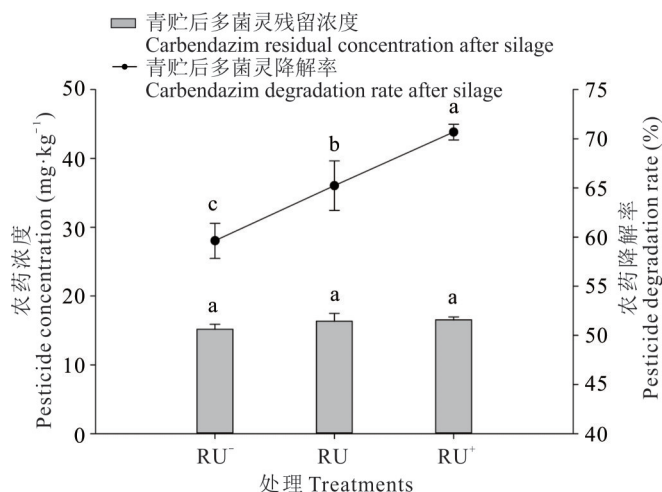


图1 果园生草白三叶青贮发酵过程对不同浓度多菌灵降解率的影响

Fig. 1 The effect of the fermentation process of orchard grass white clover silage on the degradation rate of different concentrations of carbendazim

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Different letters indicate significant differences at $P<0.05$.

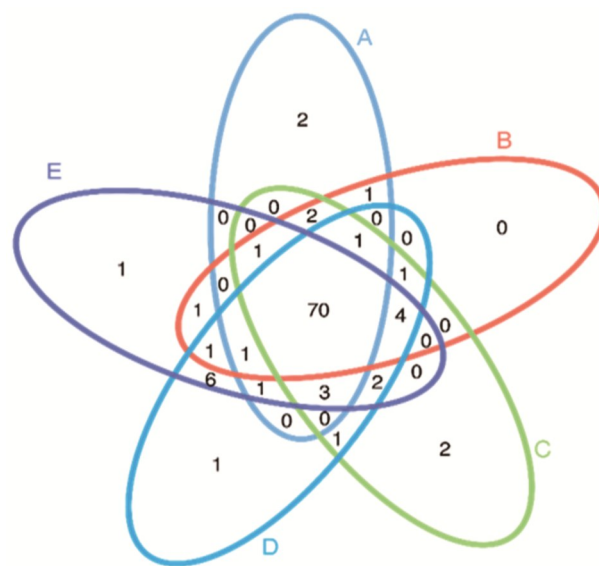


图2 OTU 韦恩图

Fig. 2 OTU Venn diagram

韦恩图中不同颜色的圈表示不同的分组,图中的数字分别代表了每个分组特有或共有的OTU数目。A:不喷施多菌灵处理白三叶青贮第0天;B:不喷施多菌灵处理白三叶青贮第3天;C:喷施多菌灵处理青贮白三叶第3天;D:喷施多菌灵处理白三叶青贮第60天;E:不喷施多菌灵处理白三叶青贮第60天。下同。Different colored circles in the Venn diagram represent different groups, and the numbers in the diagram represent the number of unique or common OTUs for each group. A: White clover silage treatment day 0 without carbendazim; B: White clover silage treatment day 3 without carbendazim; C: White clover silage treatment day 3 with carbendazim spray; D: The 60th day of white clover silage treatment with carbendazim; E: The 60th day of white clover silage treatment without carbendazim. The same below.

表 2 优化后数据质量统计

Table 2 Data quality statistics after optimization

| 测序样本名称 | 原始 PE reads 数目 | 去除嵌合体后有效序列数目 | 有效序列平均长度 | 各样品 OTU 总数 |
|------------------------|----------------|--------------|-------------|------------|
| Sequencing sample name | PE_reads | Nochimera | AvgLen (bp) | OTUs |
| 不喷施多菌灵(0 d,A) | 70933 | 66907 | 462 | 82 |
| 不喷施多菌灵(3 d,B) | 63698 | 54955 | 463 | 83 |
| 喷施多菌灵(3 d,C) | 59416 | 53199 | 463 | 87 |
| 喷施多菌灵(60 d,D) | 79630 | 68540 | 463 | 90 |
| 不喷施多菌灵(60 d,E) | 63874 | 58218 | 462 | 91 |

注：A：不喷施多菌灵处理白三叶青贮第 0 天；B：不喷施多菌灵处理白三叶青贮第 3 天；C：喷施多菌灵处理青贮白三叶第 3 天；D：喷施多菌灵处理白三叶青贮第 60 天；E：不喷施多菌灵处理白三叶青贮第 60 天。

Note: PE_reads: The number of original PE reads; Nochimera: The number of valid sequences after removing the chimera; AvgLen: The average length of the valid sequences; OTUs: The total number of OTUs in each sample; A: White clover silage treatment day 0 without carbendazim; B: White clover silage treatment day 3 without carbendazim; C: White clover silage treatment day 3 with carbendazim spray; D: The 60th day of white clover silage treatment with carbendazim; E: The 60th day of white clover silage treatment without carbendazim.

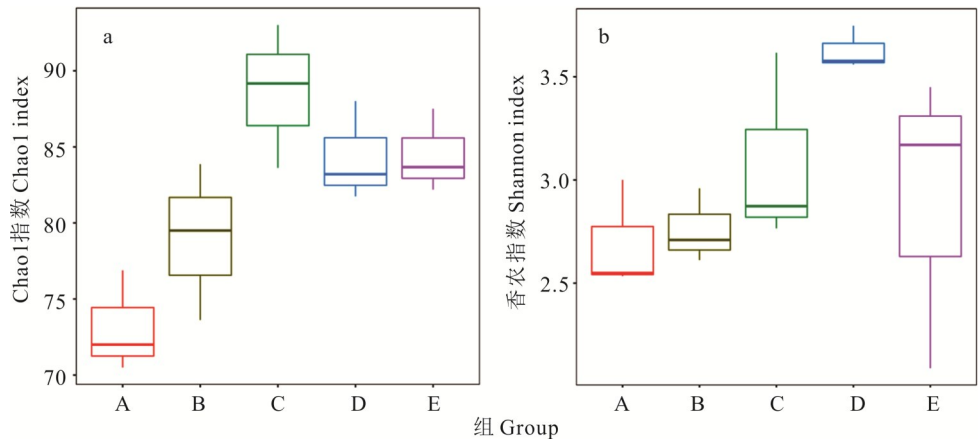


图 3 DNA 序列数据和微生物多样性指数分析

Fig. 3 DNA sequence data and microbial diversity index analysis

a) Chao 1 指数, Chao 1 指数越大, OTU 数目越多, 说明该样本物种数比较多; b) 香农指数, Shannon 指数越大, 说明群落多样性越高。a) Chao 1 index, the greater the Chao 1 index, the greater the number of OTUs, indicating that there are more species in the sample; b) The Shannon index, the greater the Shannon index, the higher the community diversity.

杆菌科(Enterobacteriaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)和芽孢杆菌科(Bacillaceae)等主要菌群。青贮 3 d 时, B 与 C 组相比, 多菌灵的喷施减少了乳酸杆菌科、链球菌科的相对丰度, 增加了明串珠菌科、肠杆菌科、假单胞菌科、芽孢杆菌科的相对丰度。青贮 60 d 时, D 与 E 组相比菌群丰度变化与青贮 3 d 时趋势一致。青贮 60 d 与 3 d 相比, 喷施多菌灵处理主要菌群表现为乳酸杆菌科、肠杆菌科丰度增加, 假单胞菌科、芽孢杆菌科、链球菌科、明串珠菌科丰度减少。

青贮细菌菌群属水平分布包括 53 个属(genus), 主要包括: 泛菌属(*Pantoea*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、*Rosenbergiella*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等菌群。青贮 3 d 时, B 与 C 组相比, 多菌灵的喷施减少了乳杆菌属、片球菌属的相对丰度, 增加了乳球菌属、魏斯氏菌属、泛菌属、*Rosenbergiella*、假单胞菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属的相对丰度。青贮 60 d 时, D 与 E 组相比, 菌群丰度变化与青贮 3 d 时趋势一致。青贮 60 d 与 3 d 相比, 喷施多菌灵处理主要菌群表现为泛菌属、乳杆菌属、*Rosenbergiella* 丰度增加, 片球菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属丰度减少。

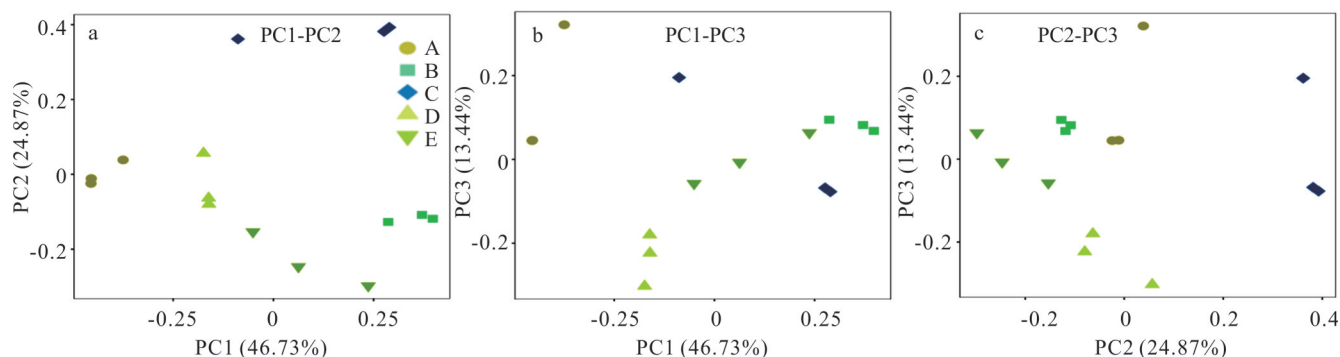


图4 基于Unifrac距离的PCoA分析

Fig. 4 PCoA analysis based on Unifrac distance

同一个组的样本使用相同颜色和形状表示。x轴与y轴分别代表第一和第二主坐标。主坐标后的百分比代表此坐标对样本差异的贡献率,度量了此主坐标对原始信息量提取的多少。样本点距离的远近代表了样本中微生物群落的相似性,距离越近,相似度越高;聚集在一起的样本由相似的微生物群落构成。The samples in the same group are represented by the same color and shape. The x-axis and y-axis represent the first and second principal coordinates, respectively. The percentage after the principal coordinate represents the contribution rate of this coordinate to the sample difference, and measures how much the principal coordinate extracts the amount of original information. The distance between the sample points represents the similarity of the microbial communities in the sample. The closer the distance, the higher the similarity; The clustered samples are composed of similar microbial communities.

3 讨论

3.1 不同浓度多菌灵对白三叶青贮发酵的影响

青贮发酵过程中产生有机酸的含量是评价青贮饲料发酵品质的重要因素^[23],而青贮过程中pH值的降低是由一些菌株通过发酵产酸来实现的^[24]。研究结果中不同浓度多菌灵处理均显著提高了白三叶青贮发酵乳酸、乙酸、丙酸的含量,可能是因为多菌灵喷施增加了乳杆菌属等产酸微生物活性导致乳酸含量增加,例如有研究表明杀菌剂百菌清对苹果酸-乳酸发酵具有一定的促进作用^[14,25]。前人研究表明,青贮发酵开始的前几天,好氧细菌比较活跃,随着时间推移,发酵体系中氧气被消耗完,乳杆菌属大量繁殖产生乳酸并降低pH,有利于抑制青贮的好氧细菌^[24]。本研究中,青贮60 d与3 d相比,喷施多菌灵处理主要菌群表现为泛菌属、乳杆菌属、*Rosenbergiella*丰度增加,与前人研究一致。同时杀菌剂可以降低酵母的活性,促进乳酸菌等产酸微生物的代谢,例如He等^[26]研究表明杀菌剂百菌清可以有效抑制酵母发酵产生酒精。

CP的降解是评估青贮饲料质量的重要标准之一,CP降解脱氨生成氨态氮^[27],芽孢杆菌属中专性厌氧菌的生长或蛋白水解酶的活性是导致青贮饲料CP降解的主要因素^[28]。本研究中喷施多菌灵农药处理较对照中芽孢杆菌属的相对丰度减少,这可能是氨态氮含量低于对照,而CP含量高于对照的原因。而在不同浓度多菌灵处理下,CF、ADF、NDF的研究结果可能是因为多菌灵农药的喷施影响了降解纤维微生物的代谢活性,或者是因为多菌灵的喷施导致乙酸含量增加,间接影响降解纤维微生物的活性。前人研究表明,梭菌属、纤维杆菌属、杆菌属、瘤胃球菌属是有效降解纤维的微生物^[29],Fang等^[30]的研究表明杀菌剂戊唑醇可以显著抑制土壤中梭菌属微生物活性,Kato等^[31]的研究表明乙酸可以抑制5种能有效降解纤维的微生物(*Clostridium straminisolvans* CSK1, *Clostridium* sp. strain FG4, *Pseudoxanthomonas* sp. strain M1-3, *Brevibacillus* sp. strain M1-5, *Bordetella* sp. strain M1-6)的降解作用,本研究中多菌灵处理乙酸含量显著高于对照与之相吻合,但具体原因还需进一步研究。

3.2 白三叶青贮发酵对多菌灵的影响

多菌灵农药广泛应用于各种作物,农药使用不当、过量造成环境污染并对牲畜及人类健康产生危害。世界各国或各组织对多菌灵含量的最低要求不同,例如:欧盟的标准是 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,澳大利亚的标准则是不超过 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,美国的标准是不超过 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,我国标准高于欧美检测,为 $5000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[32]。本研究中果园生草白三叶喷施多菌灵后经过青贮发酵,农药残留虽显著减少($P < 0.05$),但残留量还是高于安全标准。

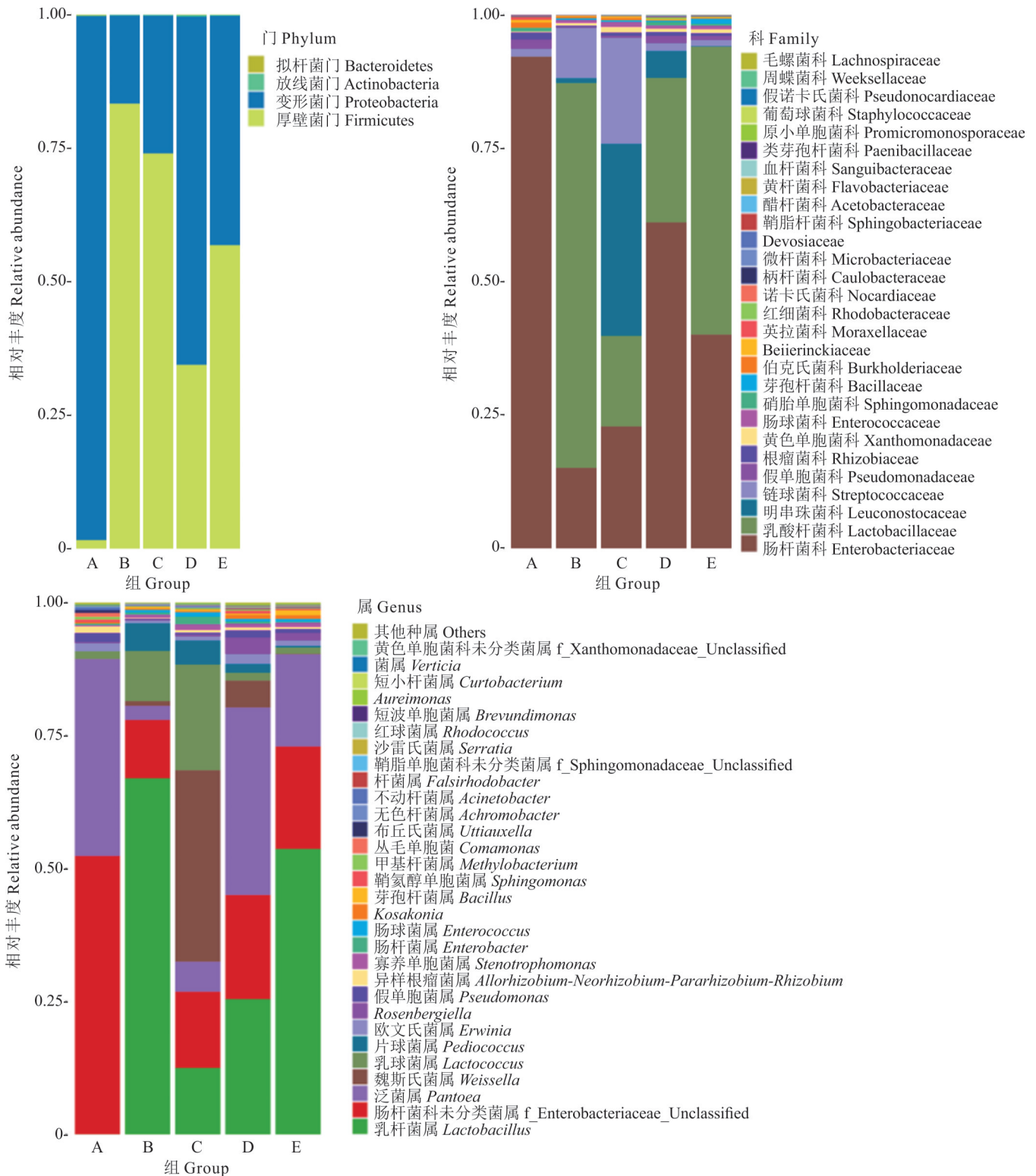


图 5 细菌群落分布

Fig. 5 Bacterial community distribution

使用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各个水平统计每个样本的群落组成,各分组在不同分类水平(门、科、属)下前 30 的菌群分布绘制为柱状图。Use RDP classifier Bayesian algorithm to perform taxonomic analysis on 97% similar level OTU representative sequences, and count the community composition of each sample at each level, and each group is in the top 30 under different classification levels (phyla, family, genus), the bacterial community distribution is plotted as a bar graph.

本试验结果可能是因为青贮发酵是多种微生物及化学物质共同作用的复杂反应过程,青贮微生物对农药的吸附作用和一部分细菌将农药作为氮源等能量利用,来促进微生物代谢过程,从而降解农药,高浓度多菌灵较低

浓度可以显著降低 pH, 为微生物提供更好的降解环境, 从而更好地降解多菌灵。例如: 蒲丹等^[33]从成都彭州蔬菜基地土壤中分离出能以多菌灵作为唯一碳氮源生长的细菌 GRPD-1, 鉴定其为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 该菌株在以多菌灵为唯一碳氮源的基础上, 在培养基中培养 6 d 对 50 mL 多菌灵的降解率达 60%。Xu 等^[34]筛选出的红球菌属能以多菌灵为唯一碳、氮源生长, 在 2~3 d 内, 可以完全降解 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多菌灵, 降解率高达 $55.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。如 Dord 等^[35]研究发现与低浓度毒死蜱相比, 高浓度毒死蜱可以更好地促进干酪乳杆菌的代谢, 从而提高毒死蜱的降解率。李杰等^[36]研究表明多菌灵易溶于酸水不溶于碱水, 所以在酸性条件下比在碱性条件时降解的更好。

3.3 多菌灵对果园生草白三叶青贮过程中微生物群落的影响

通过测定不同浓度多菌灵农药对白三叶青贮发酵的影响以及发酵后不同浓度多菌灵降解情况, 结果表明多菌灵农药对白三叶青贮发酵无负面影响, 但青贮后多菌灵农药残留较高, 可能是因为多菌灵对微生物群落的变化及微生物生长活性有一定抑制作用^[37]。为了探究青贮后多菌灵残留量高是否与多菌灵对白三叶青贮过程中微生物群落动态变化影响有关, 因此选择 RU^+ 浓度多菌灵进行研究。在群落生态学中, α 多样性可以反映微生物群落中的物种数量, 并且可以通过一系列统计指标来探索环境群落的物种丰度和多样性的估计^[38]。研究结果中菌群丰度、多样性增加可能是因为青贮前期一部分细菌将多菌灵作为氮源等能量来源来促进微生物繁殖^[34], 从而导致农药降解的同时菌群丰度及多样性得到增加。青贮 60 d 喷施多菌灵处理组菌群多样性显著下降可能是多菌灵青贮后残留浓度较高的原因之一。Zhang 等^[39]的研究表明喷施毒死蜱显著降低大肠杆菌和酵母数量, 导致农药残留较高。

为进一步了解多菌灵对白三叶青贮发酵过程中菌群结构的影响, 对不同处理样品进行主成分分析后, 发现随着时间的推移, 多菌灵被降解, 残留浓度减少, 导致多菌灵对青贮细菌菌群的结构影响减小。肖丽等^[40]的研究表明不同时间内多菌灵处理对土壤细菌群落结构影响有显著差异, 当多菌灵及其中间产物完全降解时, 120 d 后多菌灵处理的细菌群落恢复到初始水平。青贮 60 d 与 3 d 相比, 喷施多菌灵处理主要菌群表现为变形菌门丰度增加, 厚壁菌门丰度减少, 这与前人研究一致, Fang 等^[41]的研究发现变形菌门是土壤中降解多菌灵农药的主要细菌门类。而添加多菌灵使得厚壁菌门微生物丰度下降, 这说明变形菌门微生物可能对多菌灵具有耐受性, 多菌灵的添加有利于它们生长繁殖, 而对厚壁菌门微生物有抑制作用。青贮 60 d 与 3 d 相比, 喷施多菌灵处理主要菌群表现为乳酸杆菌科、肠杆菌科丰度增加, 假单胞菌科、芽孢杆菌科、链球菌科、明串珠菌科丰度减少。这可能是因为青贮环境有利于明串珠菌科的生长。Gharechahi 等^[25]的研究表明明串珠菌科在玉米 (*Zea mays*) 青贮中起主导作用。而肠杆菌科、假单胞菌科、芽孢杆菌科作为多菌灵的降解菌, 可利用多菌灵作为能量来源来生长繁殖, 从而提高丰富度。但随着农药的降解, 以及青贮环境的改变, 假单胞菌科、芽孢杆菌科丰度下降。这可能也是多菌灵残留较高的原因。青贮 60 d 与 3 d 相比, 喷施多菌灵处理主要菌群表现为泛菌属、乳杆菌属、*Rosenbergiella* 丰度增加, 片球菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属丰度减少。结果与科水平细菌菌群变化一致。多菌灵的喷施导致细菌群落结构的变化。由于青贮环境的影响以及青贮优势微生物的竞争抑制作用, 导致可以降解多菌灵, 如寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属等的细菌丰度的减少, 故在生产中可以通过添加一定寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属等多菌灵降解菌, 在青贮前期最大限度地降低多菌灵的残留浓度, 从而达到安全标准。

4 结论

1) 青贮后, 多菌灵降解率为 59.6%~70.7%, 随着农药浓度的增加降解率显著增加, 喷施多菌灵农药的白三叶青贮后农药残留未达到安全饲用标准; 与对照相比, 不同浓度多菌灵处理对白三叶青贮发酵过程中乳酸、乙酸、丙酸的产生有显著促进作用, 均显著降低了青贮环境的 pH 值, 与低浓度相比, 高浓度多菌灵处理中乳酸、乙酸、丙酸含量均显著增加; 多菌灵处理的白三叶青贮后 DM、CP、氨态氮含量与农药浓度有关。2) 高通量测序结果显示多菌灵喷施显著改变了白三叶青贮菌群群落构成, 增加了青贮的菌群丰度、多样性, 多菌灵的喷施减少了乳杆菌属、片球菌属的相对丰度, 增加了魏斯氏菌属、泛菌属、假单胞菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属的相对丰度, 不利

于青贮发酵;随着多菌灵的降解菌群丰度、多样性慢慢恢复,多菌灵的喷施刺激了乳球菌属、魏斯氏菌属、泛菌属、*Rosenbergiella*、假单胞菌属、寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属菌群的繁殖。青贮过程中,寡养单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属等具有降解多菌灵功能的菌群随着青贮时间的推移丰度减少。多菌灵通过对青贮发酵有害菌、多菌灵降解菌群丰度及青贮微生物多样性产生影响,导致青贮后多菌灵残留高于欧洲食品安全局规定的作物类动物饲料中农药最大残留量,达不到饲用标准。

参考文献 References:

- [1] Qin W L. Functions of growing grass in orchard in the construction of rural complex. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2019, 23(6): 13–17.
秦文利. 果园生草在田园综合体建设中的功能. *河北农业科学*, 2019, 23(6): 13–17.
- [2] Yang L, Mao Y F, Hu Y L, *et al.* Effects of orchard grass on soil fertility and apple tree nutrition. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2020, 26(2): 325–337.
杨露, 毛云飞, 胡艳丽, 等. 生草改善果园土壤肥力和苹果树体营养的效果. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(2): 325–337.
- [3] Li Y P, Ren Q Q, Zhang J W. Effect of growing grass on soil nutrients in orchard. *Yantai Fruits*, 2020, 4: 20–21.
李元鹏, 任倩倩, 张京伟. 生草对果园土壤养分的影响. *烟台果树*, 2020, 4: 20–21.
- [4] Gou M C. Evaluation of nitrogen metabolism ability of dominant grass species in apple orchard and effect of orchard management on soil nutrients. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.
苟铭川. 自然生草苹果园优势草氮素代谢能力及刈割管理对土壤养分的影响. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [5] Fan X L, Wen S Y, Chen J, *et al.* Effect of C/N ratio on the fertility of white clover and wheat straw compost. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2018, 27(9): 1322–1327.
范肖龙, 文素芸, 陈佳, 等. 碳氮比对白三叶和小麦秸秆堆肥的肥力影响. *西北农业学报*, 2018, 27(9): 1322–1327.
- [6] Sholberg P L, Hogue E J, Neilsen G H. Effect of orchard cover crop on incidence of low-temperature-basidiomycete rot of stored Spartan apples. *Canadian Journal of Plant Science*, 1998, 78(1): 125–129.
- [7] Ripoché A, Aurélie Metay, Celette F, *et al.* Changing the soil surface management in vineyards: Immediate and delayed effects on the growth and yield of grapevine. *Plant and Soil*, 2011, 339(1/2): 259–271.
- [8] Huang T, Ding T, Liu D, *et al.* Degradation of carbendazim in soil: Effect of sewage sludge derived biochars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(12): 3703–3710.
- [9] Wei Z H, Xu J, Guo M X, *et al.* Research progress of carbendazim in China. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(3): 125–127.
魏中华, 徐娟, 郭明霞, 等. 国内多菌灵的研究进展. *安徽农业科学*, 2015, 43(3): 125–127.
- [10] Dai H L, Tian X H, Du W H, *et al.* Effects of silage additives on nutritional quality and silage quality of triticale and rye. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(12): 213–221.
代寒凌, 田新会, 杜文华, 等. 不同添加剂处理对小黑麦和黑麦青贮营养品质和发酵品质的影响. *草业学报*, 2019, 28(12): 213–221.
- [11] Han Z Y, Wang Z Y, Liu Y N, *et al.* The effects of different additives on pH and crude protein content in corn straw silage. *Feed Review*, 2019, 7: 22–25.
韩紫燕, 王忠艳, 刘亚楠, 等. 不同添加剂对玉米秸秆青贮料pH及粗蛋白质含量的影响. *饲料博览*, 2019, 7: 22–25.
- [12] Wan X R, Dou S Y, Li Y, *et al.* Effect of lactic acid bacteria preparations on microbial population counts and silage quality in maize silage during fermentation and on aerobic exposure. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, 29(11): 83–90.
万学瑞, 豆思远, 李玉, 等. 复合乳酸菌对全株玉米青贮及有氧暴露后微生物及饲料品质的影响. *草业学报*, 2020, 29(11): 83–90.
- [13] Huang F, Zhang L, Zhou B, *et al.* Research progress of silage microorganisms and their influence on the aerobic stability of silage. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2019, 31(1): 93–100.
黄峰, 张露, 周波, 等. 青贮微生物及其对青贮饲料有氧稳定性影响的研究进展. *动物营养学报*, 2019, 31(1): 93–100.
- [14] Ruediger G A, Pardon K H, Sas A N, *et al.* Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(8): 3023–3026.
- [15] Regueiro J, Olalla López-Fernández, Rial-Otero R, *et al.* A review on the fermentation of foods and the residues of pesticides biotransformation of pesticides and effects on fermentation and food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,

- 2015, 55(6): 839—863.
- [16] Xu D M, Zhang P, Ke W C, *et al.* Research progress of silage microorganisms and its effects on silage quality. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(3): 460—465.
许冬梅, 张萍, 柯文灿, 等. 青贮微生物及其对青贮饲料发酵品质影响的研究进展. *草地学报*, 2017, 25(3): 460—465.
- [17] Silambarasan S, Abraham J. Biodegradation of carbendazim by a potent novel *Chryseobacterium* sp. JAS14 and plant growth promoting *Aeromonas caviae* JAS15 with subsequent toxicity analysis. *3 Biotech*, 2020, 10(7): 137—140.
- [18] Wang X G, Wang Y Q, Yan H, *et al.* Effects of repeated application of carbendazim on its persistence and functional diversity of soil microbial communities. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(1): 131—137.
王秀国, 王一奇, 严虎, 等. 多菌灵重复施药对其持久性及土壤微生物群落功能多样性的影响. *土壤学报*, 2010, 47(1): 131—137.
- [19] Singh S, Singh N, Kumar V, *et al.* Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*, 2016, 14(3): 317—329.
- [20] Abolmohammad B, Asghar B, Damalas C A, *et al.* Use of personal protective equipment towards pesticide exposure: Farmers' attitudes and determinants of behavior. *Science of the Total Environment*, 2018, 639: 1156—1163.
- [21] Yin X, Wang Y Q, Li X Q, *et al.* Effects of various moisture-absorbing roughages on the fermentation quality and aerobic stability of napier grass silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(7): 133—138.
尹祥, 王咏琪, 李鑫琴, 等. 不同水分吸附材料对象草青贮发酵品质及好氧稳定性的影响. *草业学报*, 2021, 30(7): 133—138.
- [22] Zhao M A, Feng Y N, Zhu Y Z, *et al.* Multi-residue method for determination of 238 pesticides in Chinese cabbage and cucumber by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Comparison of different purification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(47): 11449—11456.
- [23] He L W, Chen N, Lv H J, *et al.* Gallic acid influencing fermentation quality, nitrogen distribution and bacterial community of high-moisture mulberry leaves and stylo silage. *Bioresource Technology*, 2019, 295: 1—32.
- [24] Su R, Ni K, Wang T, *et al.* Effects of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus fermentum* and cellulase additives on the fermentation quality and microbial community of alfalfa silage. *Peer Journal*, 2019, 7: 7712.
- [25] Gharechahi J, Kharazian Z A, Sarikhan S, *et al.* The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1663—1676.
- [26] He Q, Huang J W, Yang X W, *et al.* Effect of pesticide residues in grapes on alcoholic fermentation and elimination of chlorothalonil inhibition by chlorothalonil hydrolytic dehalogenase. *Food Control*, 2016, 64: 70—76.
- [27] Junges D, Schmidt P, Novinski C O, *et al.* Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 2013, 35(4): 371—377.
- [28] Li R R, Jiang D, Tian P J, *et al.* Effects of different varieties and cutting time on fermentation quality and protein degradation of alfalfa silage. *Chinese Journal of Grassland*, 2020, 235(3): 97—104.
李荣荣, 江迪, 田朋姣, 等. 不同品种和刈割时间对苜蓿青贮发酵品质及蛋白质降解的影响. *中国草地学报*, 2020, 235(3): 97—104.
- [29] Yang F Y. Breeding of cellulolytic lactic acid bacteria. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018.
杨逢源. 纤维降解功能乳酸菌的选育. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [30] Fang H, Han L, Cui Y, *et al.* Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. *Science of the Total Environment*, 2016, 572: 1203—1212.
- [31] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al.* Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7099—7106.
- [32] Wei Z H, Xu J, Guo M X, *et al.* Research progress of carbendazim in China. *Agrochemicals Today*, 2015, 11: 18—21.
魏中华, 徐娟, 郭明霞, 等. 国内多菌灵的研究进展. *今日农药*, 2015, 11: 18—21.
- [33] Pu D, Zhang X Y, Liu G, *et al.* Identification and degrading bacteria GRPD-1 carbendazim degradation characteristics. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, 36(2): 289—295.
蒲丹, 张晓喻, 刘刚, 等. 多菌灵降解菌 GRPD-1 的鉴定及降解特性研究. *四川师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 36(2): 289—295.
- [34] Xu J L, Gu X Y, Shen B, *et al.* Isolation and characterization of a carbendazim-degrading rhodococcus sp. djl-6. *Current*

- Microbiology, 2006, 53(1): 72—76.
- [35] Dord E, Tijana M, Durovic P, *et al.* The potency of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* to dissipate organophosphorus pesticides in wheat during fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 53(12): 4205—4215.
- [36] Li J, Wang Y R, Nian H H, *et al.* The isolation, identification and degradation character of a novel carbendazim-degrading bacterium. *Journal of Huaibei Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 38(3): 37—42.
- 李杰, 王亦然, 年浩瀚, 等. 一株新的多菌灵降解菌的筛选、鉴定及其降解特性. *淮北师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(3): 37—42.
- [37] Ma Z Z, Cheng Y Y, Wang S Q, *et al.* Positive effects of dietary supplementation of three probiotics on milk yield, milk composition and intestinal flora in Sannan dairy goats varied in kind of probiotics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(3): 44—55.
- [38] Feld L, Hjelms M H, Nielsen M S, *et al.* Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by AMOA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126080.
- [39] Zhang Q, Yu Z, Wang X, *et al.* Effects of chlorpyrifos and chlorantraniliprole on fermentation quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage inoculated with or without *Lactobacillus plantarum* LP. *Animal Science Journal*, 2017, 88(3): 456—462.
- [40] Xiao L, Feng Y Y, Zhao L, *et al.* Effect of carbendazim on bacterial genetic diversity of soil. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2011, 48(9): 1640—1648.
- 肖丽, 冯燕燕, 赵靓, 等. 多菌灵对土壤细菌遗传多样性的影响. *新疆农业科学*, 2011, 48(9): 1640—1648.
- [41] Fang H, Wang Y, Gao C, *et al.* Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. *Biodegradation*, 2010, 21(6): 939—946.