

## 施加石灰石粉和微生物肥料对发病山核桃林土壤 化学性质和微生物群落的影响

方伟, 余晓, 王晶, 徐秋芳, 梁辰飞, 秦华, 陈俊辉

(浙江农林大学 环境与资源学院 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 杭州 311300)

**摘要:**【目的】揭示添加石灰石粉和微生物肥料对发病山核桃 *Carya cathayensis* 林土壤化学性质和微生物群落的影响。【方法】以死亡的山核桃林地土壤为试验对象, 开展添加对照土(ck)、石灰石粉(LP)、芽孢杆菌 *Bacillus* 液(SL)、微生物复合肥(MCF)等处理的培养试验。分别在 20、40、60、120 d 时采集土壤样品, 应用常规理化分析方法、定量 PCR 和变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)方法, 分析不同处理对山核桃林土壤化学性质、微生物群落结构的影响以及添加的有益菌剂在土壤中的竞争能力和存活时间。【结果】LP 处理提高了土壤 pH 值, 但对土壤化学性质和微生物群落没有显著影响。SL 处理和 MCF 处理显著( $P<0.05$ )增加了土壤有机质和碱解氮、有效磷和速效钾养分; SL 处理提高了土壤 pH 值, 短期内(60 d)提高了细菌和真菌的丰度, 但微生物多样性降低; MCF 处理降低土壤 pH 值, 显著( $P<0.05$ )增加了土壤真菌的丰度, 短期内(40 d)增加了细菌丰度, 但细菌群落的多样性显著降低( $P<0.05$ ), 真菌多样性增加不明显。DGGE 图谱结果表明: MCF 处理和 SL 处理添加的有益微生物有效时间长达 120 d, 能很好地发挥其促生长、增加有益菌的比例, 调节土壤微生物群落结构的作用。【结论】MCF、SL 和 LP 可明显改良山核桃林地土壤化学性状和提高土壤有益菌数量, 可作为退化山核桃林地的土壤改良剂。图 4 表 4 参 44

**关键词:** 森林土壤学; 山核桃; 干腐病; 根腐病; 土壤酸化; 芽孢杆菌; 微生物肥料

中图分类号: S714.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)02-0273-11

## Effects of applying limestone powder and microbial fertilizer on soil chemical properties and microbial community in the diseased *Carya cathayensis* woodland

FANG Wei, YU Xiao, WANG Jing, XU Qiufang, LIANG Chenfei, QIN Hua, CHEN Junhui

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, School of Environment and Resources, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] This study attempts to determine the efficacy of applying limestone powder and microbial fertilizer to enhance soil chemical properties and microbial communities in the diseased *Carya cathayensis* woodland. [Method] Soil from dead *C. cathayensis* woodland was collected for culture experiment. The four treatments tested included a control (ck) with no amendment and three amendment treatments: limestone powder (LP), *Bacillus* fluid (SL), microbial compound fertilizer (MCF). Soil samples were collected at day 20, 40, 60 and 120, and analyzed for chemical properties. Additionally, the abundances and community structures of soil bacteria and fungi were examined using quantitative PCR and PCR-DGGE, respectively. [Result] The LP greatly improved the soil pH, but had no significant effect on other soil chemical properties or microbial community structure or abundances. Both SL and MCF treatments significantly ( $P<0.05$ ) increased soil organic carbon content as well as alkali-hydrolysable nitrogen and available phosphorus and potassium. The SL treatment

收稿日期: 2019-04-12; 修回日期: 2019-09-19

基金项目: 浙江省科学技术重点研发计划项目(2015C02013); 浙江省省院合作林业科技项目(2017SY01)

作者简介: 方伟, 从事土壤质量演变与调控研究。E-mail: 1028509011@qq.com。通信作者: 徐秋芳, 教授, 博士生导师, 从事森林土壤与生物化学、农业资源高效利用研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

increased soil pH, and in the short term (60 d) increased the abundance of bacteria and fungi, but decreased microbial diversity. In contrast, MCF treatment reduced the soil pH, significantly ( $P < 0.05$ ) increased the abundance of soil fungi, and in the short term (40 d) increased bacterial abundances, but the bacterial community diversity reduced significantly ( $P < 0.05$ ) and the diversity of fungi did not increase significantly. The DGGE profiles analysis showed that the effective time for the MCF and SL treatments with adding of beneficial microbes was about 120 days, which could play a good role in promoting growth, increasing the beneficial bacteria proportion and adjusting the soil microbial community structure. [Conclusion] MCF, SL and LP can significantly improve the soil chemical traits of *C. cathayensis* woodland and increase the number of beneficial bacteria in soil. It can be used as a soil amendment for degraded *C. cathayensis* woodland. [Ch, 4 fig. 4 tab. 44 ref.]

**Key words:** forest pedology; *Carya cathayensis*; dry rot disease; root rot disease; soil acidification; *Bacillus*; microbial fertilizer

山核桃 *Carya cathayensis* 是中国特有的珍贵干果。近年来, 山核桃造林面积快速增加, 大量施用农药化肥和人为过度经营, 山核桃根腐病的发生面积也逐步增大, 导致根腐病和干腐病日益严重, 造成山核桃林下植被破坏、土壤肥力和 pH 值下降<sup>[1]</sup>, 给农户造成重大经济损失。研究者对山核桃干腐病和根腐病病原菌进行分离鉴定<sup>[2-4]</sup>, 证明干腐病的发生与子囊菌门葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* 真菌有着密切联系<sup>[5]</sup>, 根腐病主要病原菌是尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*<sup>[6]</sup>。土壤酸化、根系腐烂是农业生产连作障碍的常见现象<sup>[7-8]</sup>, 也是土壤微生物区系失衡, 真菌比例增加的主要原因<sup>[9-11]</sup>。因此, 提高土壤 pH 值是解决连作障碍的重要手段之一。大量研究表明: 在酸性土壤中施用生石灰可提高土壤 pH 值, 调节土壤微生物的数量、分布和组成, 对植物的生理机能较好的促进和改善作用<sup>[12-13]</sup>。同时, 添加有益微生物及菌剂型生物肥料也是改善退化土壤微生物区系的措施之一。杨星<sup>[14]</sup>研究发现: 施用微生物肥料能提高土壤微生物多样性和抑制病原菌的生长; 土壤中添加哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum* 对辣椒 *Capsicum annuum*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、黄瓜 *Cucumis sativus*、花生 *Arachis hypogaea*、白菜 *Brassica pekinensis* 等抗病实验表明: 哈茨木霉菌对多种农作物有促生和抗病效应<sup>[15-17]</sup>。而芽孢杆菌 *Bacillus* 作为一种生防菌对果树病原菌有较好的抑制效果, 其抑制作用是通过菌体及其产生的拮抗物质或分泌水解酶(蛋白酶和纤维素酶)实现的<sup>[18]</sup>。然而, 益生菌在生产中的应用效果差异很大。许多有益菌株在实验室研究效果很好, 但应用到大田土壤中则因为难以与土著微生物竞争, 很难在土壤中长期发挥其作用。为了解决山核桃林地土壤退化、山核桃干腐病和根腐病等问题, 本研究以解淀粉芽孢杆菌为对象, 设计了提高土壤 pH 值、添加有益菌、施用有益菌菌肥等 3 种调控措施, 应用定量 PCR 以及 PCR-DGGE 技术, 监测调控措施对土壤细菌和真菌结构动态变化的影响以及添加的有益菌在土壤中的存活时间。研究结果对指导目标菌种及其肥料的应用具有重要的实践意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验概况

1.1.1 盆栽土壤与实验材料 试验土壤为浙江省杭州市临安区湍口乡的山核桃林地石灰岩土壤。采样深度为 0~30 cm, 属阳面山地干腐病和根腐病较严重的山核桃林地土壤, 常规施用肥料为氨基酸复混肥料(河南莲花味精股份有限公司), 磷、氮、钾质量分数为 30%。每年施 3 次肥, 每次用量 2 kg·株<sup>-1</sup>, 施肥时间为每年 9-10 月及 3 月底和 6 月。土壤基本理化性质: pH 6.2, 有机质 16.51 g·kg<sup>-1</sup>, 碱解氮 132.20 mg·kg<sup>-1</sup>, 有效磷 5.81 mg·kg<sup>-1</sup>, 速效钾 116.60 mg·kg<sup>-1</sup>。

3 种土壤调节材料分别为: ①石灰石粉末(CaCO<sub>3</sub>), 采自当地的石灰石矿区; ②芽孢杆菌发酵液为浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室前期筛选的具有抑制核桃干腐病的芽孢杆菌(菌种保藏号: CGMCC11640), 发酵液所含养分分别为氮 0.236 mg·L<sup>-1</sup>, 磷 516.960 mg·L<sup>-1</sup>, 钾 39.000 mg·L<sup>-1</sup>, 钙 2.310 mg·L<sup>-1</sup>, 镁 1.680 mg·L<sup>-1</sup>, 铁 0.077 mg·L<sup>-1</sup>, 铜 0.002 mg·L<sup>-1</sup>, 锌 0.067 mg·L<sup>-1</sup>, 硼 0.092 mg·L<sup>-1</sup>。pH 6.82。③复合微生物肥料(江阴市联业生物公司提供), 肥料含有芽孢杆菌和哈茨木霉 2 种有益菌, pH 值

6.50, 总有效活菌数为(菌落形成单位) $0.56 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ , 养分: 氮  $29.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 五氧化二磷  $64.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 氧化钾  $11.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 有机质  $456.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 可溶性氨基酸  $15.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.1.2 试验设计 土壤培养试验设置 4 个处理: ①无添加的对照(ck); ②添加 2.5%(w/w)石灰石粉(LP); ③添加芽孢杆菌发酵液(SL); ④添加 2%(w/w)复合微生物肥料(MCF)。每个处理 3 个重复。称取过 2 mm 筛风干土壤 4.60 kg 于花盆(高 26 cm, 径 24 cm)中, 将各个处理加入的材料混合均匀, 用蒸馏水调节土壤含水量到田间持水量的 30%。菌液处理量取 450 g 发酵液与水混合, 保证与其他处理的水分相等。培养试验开始于 2016 年 11 月 15 日, 用塑料薄膜封盖防止水分蒸发过快, 同时, 隔 2 d 对沙床补充水分, 保证沙子的湿度。盆栽进行过程中定期称量补水, 保持盆栽水分含量恒定。培养周期为 120 d。

1.1.3 样品采集与分析 在培养开始后 20、40、60、120 d 进行土壤采集, 土样采集深度为 5~10 cm, 土壤混匀分 2 份, 1 份自然风干过 1 mm 和 0.149 mm 土壤筛, 用于测土壤化学指标: 土壤 pH( $m_{\text{水}}: m_{\text{土}} = 2.5:1.0$ ); 有机质用重铬酸钾-硫酸外加热法<sup>[19]</sup>; 碱解氮用碱解扩散法<sup>[19]</sup>; 有效磷用碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )浸提后钼锑抗比色法测定<sup>[19]</sup>; 速效钾用醋酸铵浸提然后使用火焰光度计测定<sup>[19]</sup>。另一份土壤经冷冻干燥处理, 使用 DNA 提取试剂盒提取土壤总 DNA, 用作分子生物学实验。

## 1.2 分析方法

1.2.1 土壤总 DNA 的提取和 rDNA 的 PCR 扩增 称取 0.50 g 冻干土提取总 DNA, 使用提取试剂盒 Power Soil® DNA Isolation Kit(Mo Bio, 美国); Bovine Serum Albumin(BSA,  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , TaKaRa, 中国大连); Goldview(SBS, 中国上海); 荧光染料 SYBR green I(Invitrogen, 美国); 质粒提取试剂盒, SYBR® Premix Ex Taq™(Takara, 中国大连); 引物由上海生物工程有限公司合成。DNA 提取方法按试剂盒使用说明书, 提取的 DNA 片段经  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 用微量分光光度计进行浓度测定<sup>[20]</sup> (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, 美国), DNA 样品分装并保存于  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱。

PCR 用  $50 \mu\text{L}$  反应体系:  $10 \times$  Premix Taq  $25.00 \mu\text{L}$ , 引物各  $0.50 \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $0.75 \mu\text{L}$ ,  $0.50 \mu\text{L}$  BSA( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用灭菌超纯水补足至  $50.00 \mu\text{L}$ (PCR 引物见表 1.2)。扩增程序参考赵天心等<sup>[20]</sup>, 反应设置阴性对照组, 经  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用 Goldview 染色, 确认其片段大小, 保存在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 用于变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。

1.2.2 DGGE 染色及凝胶成像分析 使用 D-Code TM Universal Mutation Detection System(Bio-Rad, 美国)进行 DGGE 分析, 方法参考赵天心等<sup>[20]</sup>。在体积分数为 6%的聚丙烯酰胺和变性梯度 40%~60%(V/V)的凝胶上进行电泳[100%变性胶含有  $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素和 40%(V/V)甲酰胺], 胶厚度为 1 mm, 电泳缓冲液为  $1 \times \text{TAE}$ , 取 10.0 L 第 2 轮 PCR 产物与 10.0 L  $6 \times$  loading buffer 混匀后用微量进样器加样, 在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $80 \text{ V}$  条件下电泳 13 h<sup>[20-21]</sup>。

1.2.3 DGGE 谱图分析 电泳结束后, 凝胶使用 SYBR green I(1:10 000)染料染色 30 min 后在 Gel Doc™ EQ 凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)拍照并保存, 利用 Quantity One 4.6.2(Bio-Rad, 美国)软件对图进行数字化分析。条带的数目表明样品的基因型丰富度(Ggenotypic richness, S)<sup>[22]</sup>, 用 Quantity One 软件检测条带的相对亮度即为该基因型的相对多度( $P_i$ )<sup>[23]</sup>。用基因型丰富度、多样性指数(Shannon-Wiener diversity index,  $H'$ )和 Pielou 均匀度指数(Pielou evenness index,  $E$ )表征土壤微生物群落的基因型多样性(genotypic genotypic diversity)特征。

1.2.4 土壤细菌真菌丰度-实时荧光定量 PCR 用土壤总 DNA 作为模板, FR1、FF390(真菌)和 338F、518R(细菌)为引物(表 1),  $20.0 \mu\text{L}$  反应体系<sup>[20]</sup>:  $2 \times \text{SYBR Premix Ex Taq}^{\text{TM}}$   $10.0 \mu\text{L}$ , 上下游引物各  $0.2 \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $1.0 \mu\text{L}$ , 灭菌超纯水补足  $20.0 \mu\text{L}$ , 每个样品 3 次重复, 反应程序具体如下: 真菌, 预变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min; 变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 退火  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 31 个循环; 溶解曲线过程( $65 \text{ }^\circ\text{C}$  到  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $0.5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$ ); 细菌, 预变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min; 变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 退火

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

巢式 PCR	引物	序列(5'→3')	参考文献
真菌	GC-FR1	AICCATTCAATCGGTAIT	VAINIO 等 <sup>[24]</sup>
	FF390	CGATAACGAACGAGACCT	VAINIO 等 <sup>[24]</sup>
细菌 (DGGE 用)	GC-968F	AACGCGAAGAACCTTAC	YU 等 <sup>[25]</sup>
	1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	YU 等 <sup>[25]</sup>
细菌 (QPCR 用)	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGC	YU 等 <sup>[25]</sup>
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	YU 等 <sup>[25]</sup>

说明: GC 夹序列为 CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCGCGCCCGCCG

56 ℃ 30 s, 最后 72 ℃ 延伸 30 s, 31 个循环; 溶解曲线过程(65 ℃ 到 95 ℃, 0.5 ℃·s<sup>-1</sup>)。标准曲线制作: 用已知种属的阳性克隆子扩增培养后提取质粒 DNA, 检测其浓度和纯度 [ $D(260)/D(280)$ ] 后, 将质粒以 10 倍梯度稀释 ( $10^{-3}$ ~ $10^{-8}$ ), 作为标准样品, 计算细菌真菌的基因拷贝数<sup>[26]</sup>。反应程序和体系反应体系同上。

### 1.3 数据分析

图表使用 Excel 2016 和 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 各处理间比较采用 One-way ANOVA 分析, 差异显著性分析用 Duncan 法进行数据统计 ( $P < 0.05$ )。DGGE 图谱参考余晓等<sup>[21]</sup>方法用 Quantity One 软件数字化, 用 Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ )、丰富度指数 ( $D$ ) 以及均匀度指数 ( $E$ ) 对土壤细菌和真菌多样性进行分析<sup>[27]</sup>。其计算公式分别为:

$$H' = \sum_{i=1}^N (n_i/N) \ln(n_i/N); \quad (1)$$

$$D = (S-1)/\ln N; \quad (2)$$

$$E = H'/\ln S. \quad (3)$$

式(1)~(3)中:  $n_i$  为每条电泳条带光密度峰值,  $N$  是同一泳道中所有条带光密度峰值的总和,  $S$  为每一泳道总共的条带数。光密度峰值通过 Quantity One 软件分析获取<sup>[24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同调控措施对土壤理化性质的影响

表 2 比较了 4 个处理在 120 d 培养周期中对土壤化学性质的影响。在培养周期中, 从各指标结果来看, LP 处理显著提高了土壤 pH 值和土壤有机质质量分数 ( $P < 0.05$ ), 但对土壤其他养分质量分数无显著影响。MCF 处理在 120 d 时显著 ( $P < 0.05$ ) 降低了土壤 pH 值, MCF、SL 处理与 ck 显著 ( $P < 0.05$ ) 提高了土壤有机质和土壤有效磷, 同时 MCF 处理也显著 ( $P < 0.05$ ) 提高了土壤碱解氮和速效钾, MCF 处理降低了土壤 pH 值 (6.29~5.34), 而 SL 处理提高了土壤 pH 值。

表 2 不同调控措施对土壤养分的影响

Table 2 Effects of different treatments on soil nutrients

培养时间/d	处理	pH 值	有机质/(g·kg <sup>-1</sup> )	碱解氮/(mg·kg <sup>-1</sup> )	有效磷/(mg·kg <sup>-1</sup> )	速效钾/(mg·kg <sup>-1</sup> )
20	ck	6.29 ± 0.02 bc	16.50 ± 3.02 d	132.16 ± 1.95 c	5.81 ± 0.19 c	116.3 ± 0.9 c
	LP	8.00 ± 0.14 a	19.07 ± 1.08 c	113.34 ± 2.37 c	6.24 ± 0.53 c	112.3 ± 3.5 c
	SL	6.56 ± 0.07 b	30.58 ± 2.23 b	220.50 ± 5.93 b	9.50 ± 0.51 b	137.7 ± 9.2 b
	MCF	6.22 ± 0.05 c	39.58 ± 1.15 a	334.28 ± 10.31 a	95.91 ± 1.71 a	309.0 ± 5.0 a
120	ck	6.58 ± 0.11 b	15.21 ± 3.64 b	81.04 ± 11.18 bc	5.14 ± 0.70 c	97.7 ± 5.4 b
	LP	7.62 ± 0.04 a	14.59 ± 3.32 b	62.25 ± 5.31 c	6.68 ± 0.28 c	81.0 ± 4.9 b
	SL	6.72 ± 0.03 b	31.96 ± 1.44 b	92.30 ± 4.01 b	20.85 ± 9.45 b	139.3 ± 5.4 b
	MCF	5.34 ± 0.02 c	36.23 ± 3.28 a	219.50 ± 15.57 a	91.50 ± 12.02 a	276.6 ± 18 a

说明: 采用 Duncan 新复极差法进行多重比较, 同一时间内每列不同字母表示在 0.05 水平下差异显著

### 2.2 不同调控措施对土壤细菌和真菌丰度影响

2.2.1 调控措施对土壤细菌丰度的影响 120 d 培养过程中土壤细菌丰度变化如图 1。从随培养时间细菌丰度变化来看, 4 种处理土壤细菌丰度总体呈下降趋势。SL 处理细菌数量呈先增加再减少趋势, 在 20 d 时与 MCF 处理差异不显著, 20 d 后 SL 处理和其他 3 种处理比较都存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 在 40 d 达到最高  $6.02 \times 10^8$  g<sup>-1</sup>。MCF 处理细菌丰度在 20 d 时高于其他 3 种处理, 培养过程中呈下降趋势, 60 d 后和 ck 比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )。LP 处理在 20~60 d 均提高了土壤细菌丰度, 120 d 时和 ck 比较差异不显著 ( $P > 0.05$ )。结果表明: SL 处理在整个培养周期中显著 ( $P < 0.05$ ) 提高了土壤细菌数量, MCF 处理在 20~40 d 显著 ( $P < 0.05$ ) 提高了土壤细菌数量, LP 处理在 60 d 显著 ( $P < 0.05$ ) 提高了土壤细菌数量。

2.2.2 不同调控措施对土壤真菌丰度的影响 120 d 培养过程中土壤真菌丰度变化如图 2 所示: 在整个

培养周期中, 4 种处理真菌基因拷贝数呈先上升再下降趋势。MCF 处理的土壤真菌丰度在 4 个时期高于其他处理且有显著差异( $P<0.05$ ), 在 40 d 时真菌基因拷贝数达最高, 为  $8.73\times 10^7$   $g^{-1}$ 。与 ck 相比, SL 处理的土壤真菌拷贝数在 20~60 d 显著增加( $P<0.05$ ), LP 处理的土壤仅在 40 d 时高于 ck, 有显著差异( $P<0.05$ ), 其他时期无明显差异。

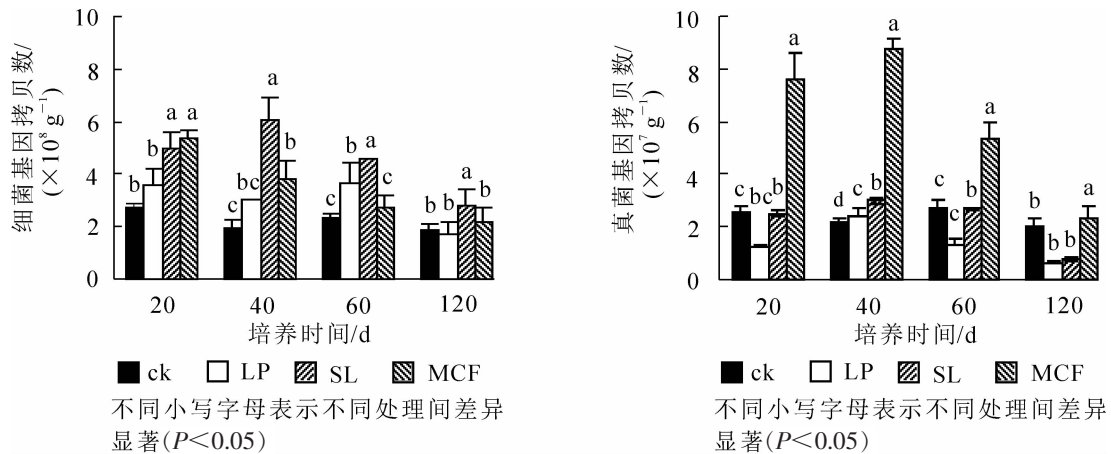


图 1 不同调控措施下土壤细菌丰度的动态变化 Figure 1 Dynamics of soil bacteria abundance with different treatments  
图 2 不同调控措施下土壤真菌丰度的动态变化 Figure 2 Dynamics of soil fungi abundance with different treatments

### 2.3 不同调控措施对土壤细菌和真菌群落结构及多样性影响

2.3.1 不同调控措施对土壤细菌结构的影响 对 4 次采集的土壤细菌进行 PCR-DGGE 分析(图 3), 不同的条带代表不同的细菌基因片段, 每个泳道中条带的亮度反映出细菌相对生物量的多少。首先对培养 20 d 土壤 DNA 进行 PCR-DGGE, 将几个优势条带割胶, 用相同的引物扩增, 用作定位标记(Marker), 目的是分析这些优势条带的动态变化, 再分析不同培养时间土壤细菌的 DGGE。结果表明: 培养 20 d 时, 不同处理条带存在差异, 但同一处理 3 个重复之间相似度很好, 说明培养实验控制良好。所有处理有 3 条较亮的共性条带(条带 1、4、6), 条带 6 不受处理影响, 而条带 1 则是菌液处理亮度反而最弱, 条带 4 则是复合微生物肥料处理稍微弱一点。个性条带分析发现, 条带 5 最亮, 该条带由目标菌——芽孢杆菌 WK1 产生, 同时发现复合微生物肥料处理土壤其条带 5 的亮度比对照和石灰石粉处理高。条带 2 是石灰石粉处理的特征条带, 但培养到 40 d 时, 菌液处理也出现条带 2。随着培养时间的增加, 大部分条带变化不大, 而作为菌液的优势条带 5 在菌液处理在 120 d 之内一直保持最强亮度, 说明添加的芽孢杆菌能很好地与土壤微生物竞争而繁殖生长, 但发现条带 5 的位置在 40 d 时出现新的条带, 推测新条带与原条带的间隔随着培养时间的增加而增加, 因为 PCR-DGGE 的条件完全相同, 推测可能是原土壤存在的菌, 因生长状况良好, 而被优先扩增出来。根据细菌 PCR-DGGE 图谱中条带位置和亮度的数值化结果, 计算得细菌的多样性指数、均匀度指数和丰富度指数(表 3)。多样性指数越大表示微生物群落多样性越高, 均匀度指数说明不同物种的数量均等程度, 丰富度指数高则说明物种数目多。多样性指数结果分析表明: ck 处理多样性指数在整个培养过程中高于其他处理, 60 d 之前显著( $P<0.05$ )高于 SL 和 MCF 处理, 说明添加菌液、施用微生物肥料降低了细菌的生物多样性; LP 处理在前 40 d 时与对照持平, 60 d 时显著( $P<0.05$ )低于对照, 但高于( $P<0.05$ )菌液和复合微生物肥料处理。不同处理之间丰富度指数差异变化规律与多样性指数一致。SL 处理土壤细菌均匀度指数和其他 3 种处理相比, 存在显著差异( $P<0.05$ ), 而 LP、MCF 和 ck 等 3 种处理间细菌均匀度指数没有差异。

2.3.2 不同调控措施对土壤真菌结构的影响 土壤真菌的 PCR-DGGE 结果表明: 复合微生物肥处理后, 其真菌 DGGE 图谱结构明显不同于其他 3 个处理(图 4), 所有处理和培养时间有 3 条优势共性条带(条带 1、5、8), 培养 20 d 时复合微生物肥料土壤条带 1 的亮度低于其他 3 个处理, 但 40 d 以后亮度差异消失。微生物肥料处理有 5 个特征条带(条带 2、3、4、6 和 7), 这些特征条带在前 60 d 时变化不大, 但第 120 天时只剩下条带 2, 其余基本消失或非常弱。而且培养 120 d 时所有条带亮度均较低, 说明此

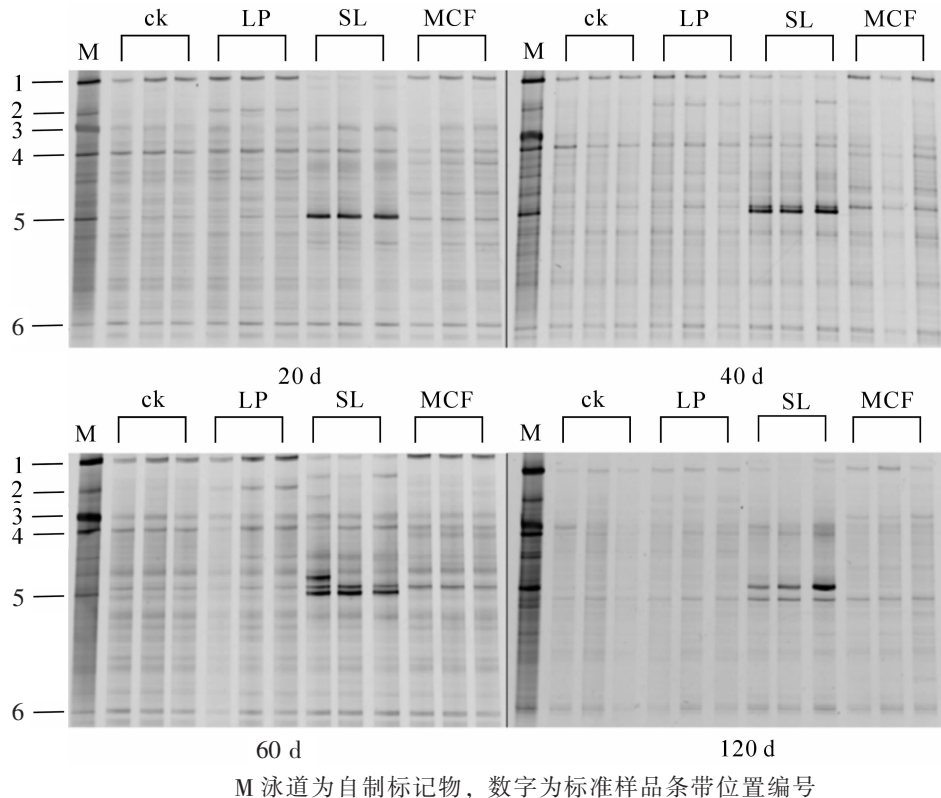


图3 不同调控措施下土壤中细菌群落不同时间下的 DGGE 图谱  
Figure 3 DGGE fingerprinting of bacteria in soils with different treatments and time experiment

表3 不同调控措施下土壤细菌群落多样性分析

Table 3 Biodiversity indices of soil bacteria in the soils with different treatments

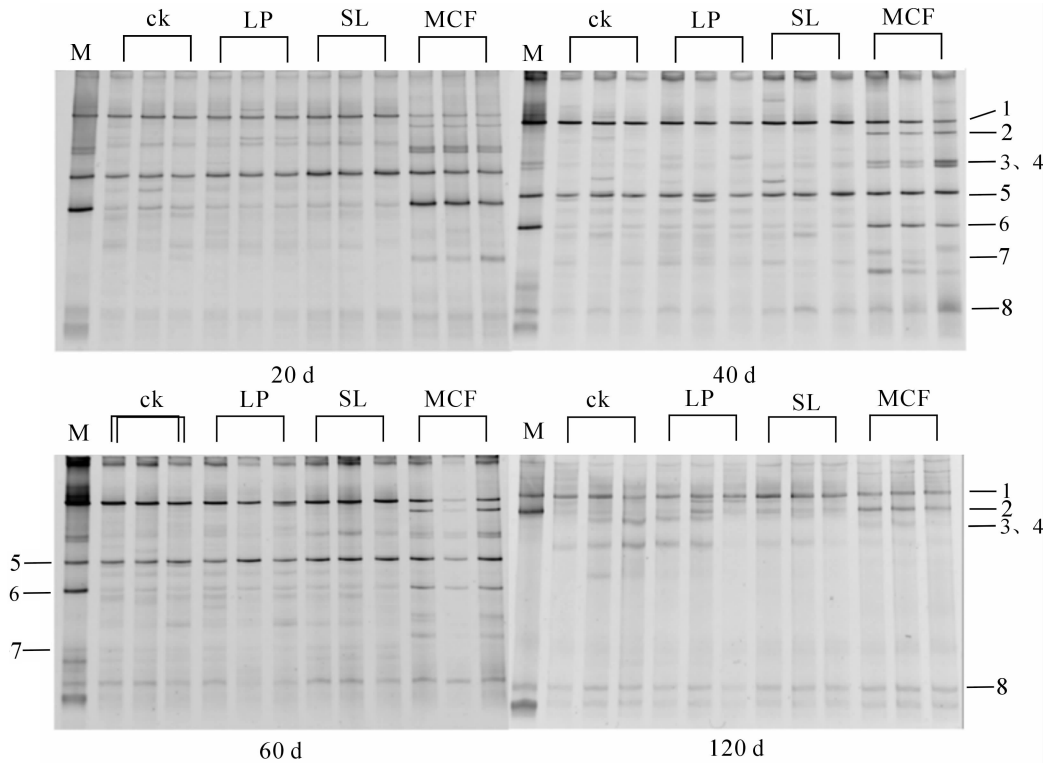
培养时间/d	处理	多样性指数 ( $H'$ )	均匀度指数 ( $E$ )	丰富度指数 ( $D$ )	培养时间/d	处理	多样性指数 ( $H'$ )	均匀度指数 ( $E$ )	丰富度指数 ( $D$ )
20	ck	$3.14 \pm 0.06$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$2.31 \pm 0.12$ a	60	ck	$3.11 \pm 0.02$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$2.20 \pm 0.03$ a
	LP	$3.11 \pm 0.03$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$2.25 \pm 0.06$ a		LP	$2.87 \pm 0.01$ b	$0.99 \pm 0.00$ a	$1.79 \pm 0.04$ b
	SL	$2.33 \pm 0.08$ c	$0.96 \pm 0.00$ b	$1.12 \pm 0.09$ c		SL	$2.64 \pm 0.02$ c	$0.97 \pm 0.01$ b	$1.46 \pm 0.01$ c
	MCF	$2.63 \pm 0.07$ b	$1.00 \pm 0.00$ a	$1.43 \pm 0.08$ b		MCF	$2.87 \pm 0.10$ b	$0.99 \pm 0.01$ a	$1.80 \pm 0.21$ b
40	ck	$3.14 \pm 0.11$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$2.22 \pm 0.05$ a	120	ck	$2.80 \pm 0.20$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$1.65 \pm 0.29$ a
	LP	$3.11 \pm 0.05$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$2.25 \pm 0.06$ a		LP	$2.79 \pm 0.13$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$1.62 \pm 0.19$ a
	SL	$2.33 \pm 0.15$ c	$0.96 \pm 0.01$ b	$1.12 \pm 0.09$ c		SL	$2.35 \pm 0.25$ b	$0.99 \pm 0.01$ b	$1.08 \pm 0.27$ b
	MCF	$2.63 \pm 0.12$ b	$1.00 \pm 0.00$ a	$1.43 \pm 0.08$ b		MCF	$2.92 \pm 0.15$ a	$1.00 \pm 0.00$ a	$1.85 \pm 0.27$ a

说明: 采用 Duncan 新复极差法进行多重比较, 同一时间内每列不同字母表示在 0.05 水平下差异显著

时土壤真菌的总体数量下降明显。对真菌的 PCR-DGGE 图谱进行 Shannon-Wiener 指数分析(表 4): 20 d 时 LP 处理和 SL 处理有显著性差异( $P < 0.05$ ), 但培养 20 d 时 LP 处理的土壤真菌多样性和丰富度指数高于其他 3 种处理, 40~120 d 期间添加菌液处理的土壤真菌多样性指数和丰富度指数在各个时期低于其他处理。MCF 处理的多样性指数和丰富度指数在 20 d 时低于 ck, 但无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

土壤微生物的数量动态变化是反映土壤总微生物活性的一个重要参数, 与土壤质量、健康状况和生产力密切相关。近些年, 随生态农业的发展和社会对环境保护的日益重视, 不断深入研究林地连作障碍, 并积极研发新型肥料(尤其是菌肥)来替代农药和化肥<sup>[28]</sup>成为热点。逢焕成等<sup>[29]</sup>用微生物菌剂处理土壤, 使土壤速效钾、碱解氮、有效磷和有机质分别提高了 28.9%、50.2%、71.4%和 55.9%。本研究表



M泳道为自制标记物，数字为标准样品条带位置编号

图 4 不同调控措施下土壤中真菌群落在不同时间下的 DGGE 图谱

Figure 4 DGGE fingerprinting of fungi in soils with different treatments and time experiment

表 4 不同调控措施下土壤真菌群落多样性分析

Table 4 Biodiversity indices of soil fungi with different treatments and experiment time

培养时间/d	处理	多样性指数 (H')	均匀度指数 (E)	丰富度指数 (D)	培养时间/d	处理	多样性指数 (H')	均匀度指数 (E)	丰富度指数 (D)
20	ck	2.46 ± 0.08 ab	0.99 ± 0.00 ab	1.20 ± 0.11 ab	60	ck	2.81 ± 0.50 a	0.95 ± 0.05 a	1.96 ± 0.29 a
	LP	2.57 ± 0.09 a	0.99 ± 0.00 a	1.34 ± 0.12 a		LP	2.87 ± 0.01 a	0.99 ± 0.00 a	1.79 ± 0.04 ab
	SL	2.26 ± 0.20 b	0.99 ± 0.00 b	1.00 ± 0.21 b		SL	2.64 ± 0.02 a	0.97 ± 0.01 a	1.46 ± 0.01 b
	MCF	2.25 ± 0.05 b	0.99 ± 0.00 ab	0.96 ± 0.05 b		MCF	2.87 ± 0.10 a	0.99 ± 0.01 a	1.80 ± 0.21 ab
40	ck	2.09 ± 0.11 a	0.88 ± 0.02 b	1.21 ± 0.21 a	120	ck	2.80 ± 0.12 a	1.00 ± 0.00 a	1.65 ± 0.17 a
	LP	2.25 ± 0.09 a	0.89 ± 0.01 b	1.40 ± 0.18 a		LP	2.79 ± 0.08 a	1.00 ± 0.00 a	1.62 ± 0.11 a
	SL	2.12 ± 0.17 a	0.86 ± 0.02 b	1.28 ± 0.15 a		SL	2.35 ± 0.14 b	0.99 ± 0.00 b	1.08 ± 0.15 b
	MCF	2.25 ± 0.03 a	0.94 ± 0.01 a	1.19 ± 0.04 a		MCF	2.92 ± 0.08 a	1.00 ± 0.00 a	1.85 ± 0.16 a

说明：采用 Duncan 新复极差法进行多重比较，同一时间内每列不同字母表示在 0.05 水平下差异显著

有机质质量分数，但对于土壤肥效的提高表现为前期大于后期。石灰石粉对土壤养分无显著提高作用，对土壤 pH 值的调控效果最快，能显著提高土壤 pH 值，达到山核桃生长的理想范围，而该地常用生石灰调节土壤酸度，可以短期内提高土壤 pH 值，但对植物根系以及土壤微生物有很大伤害<sup>[30]</sup>，常发生因施用不均匀引发局部土壤强碱现象，不适合人工翻耕的山地土壤。因此，对于林地土壤酸度调节而言，施用石灰石粉不仅比传统的生石灰效果更好、经济成本低，而且持久效果更好，长达 4 a 以上<sup>[31]</sup>。复合微生物肥可调节土壤酸度，显著降低土壤 pH 值，可能是施入土壤后肥料中的有机质矿化以及氮的硝化作用造成。因此，施用菌液和复合微生物肥料能显著改善土壤理化性状，对科学合理施肥，提高山核桃林地土壤质量有极其重要指导意义。

本研究表明：不同处理细菌基因拷贝数达  $10^8 \text{ g}^{-1}$  左右，真菌基因拷贝数达  $10^6 \sim 10^7 \text{ g}^{-1}$ ，低于辜运富等<sup>[32]</sup>在植烟土壤测定的基因拷贝数，可能是 2 种作物土壤性质差异造成的。石灰石粉处理对细菌的丰度作用不明显，只在施用后 60 d 时高于对照 ( $P < 0.05$ )。由于生产上有施用生石灰调节 pH 值的措施，所

以本底土壤 pH 值呈微酸性(6.29)。一般认为:中性土壤有利于细菌繁殖。本研究中施用石灰石粉提高土壤 pH 值至 8.0 以上对土壤细菌丰度无显著促进作用。菌液处理 40 d 时土壤细菌丰度最高,短期施用菌液和复合微生物肥料显著提高了细菌和真菌数量,和胡可等<sup>[33]</sup>、康萍芝等<sup>[34]</sup>研究结果一致。原因是菌液和复合微生物肥料含有大量养分,为细菌和真菌的生长提供了丰富的碳源和能源,同时菌液和复合微生物肥料本身含有大量添加的菌种。40 d 后复合微生物肥处理真菌丰度下降幅度较大,可能是真菌对复杂有机碳的依赖性比细菌强,肥料中添加有哈茨木霉,该菌前期生长繁殖快,成为优势菌种,40 d 时大部分复杂的有机碳被微生物分解利用,导致真菌下降幅度较大<sup>[35]</sup>。

土壤微生物群落多样性提高不仅能促进土壤生态系统的稳定,而且能延缓土壤微生物生态环境的恶化<sup>[36]</sup>。高雪莲等<sup>[37]</sup>通过 DGGE 技术研究发现:施用生物有机肥后甜瓜 *Cucumis melo* 根际细菌和放线菌的数目明显高于对照土壤,病原菌和真菌数量迅速减少。本研究中,DGGE 图谱表明不同处理土样间大部分条带相似,细菌和真菌 DGGE 图谱中菌液处理条带减少,细菌 DGGE 图谱出现颜色较深条带(条带 5),说明施用菌液抑制其他菌落生长,增加了土壤优势菌群数量,改变了土壤微生物群落结构。复合微生物肥料处理的细菌 DGGE 图谱中,仅条带 5 颜色较其他条带深,其他条带无明显变化,而真菌 DGGE 图谱条带数减少,4 条带颜色较深,说明施用复合微生物肥料能增加有益菌数量,抑制土壤中其他真菌的生长。也有研究证实:向土壤添加有益菌,能有效改善土壤肥力,抑制病原菌,增加微生物群落多样性和提高植株抗病能力<sup>[38-40]</sup>。对 DGGE 图谱信息的多样性指数分析发现,添加菌液后土壤细菌多样性指数和丰富度指数下降,与游偲等<sup>[41]</sup>结果相反。可能的原因之一是外加的菌数量增加明显,抑制了某些土著细菌的生长<sup>[42]</sup>。原因之二是外加的菌数量增加明显,扩大了多样性指数计算公式的分母。复合微生物肥料处理的土壤细菌多样性指数和丰富度指数明显低于对照,真菌多样性指数和丰富度指数无显著变化,李朔<sup>[43]</sup>和吴恩彪<sup>[44]</sup>研究得出施用微生物肥料能增加土壤微生物的多样性的结果不一致,原因是他们的微生物肥料中含有多种微生物,而本研究使用的复合微生物肥料只含有哈茨木霉和芽孢杆菌 2 种菌。

## 4 结论

添加石灰石粉能显著提高山核桃林地土壤 pH 值,施用菌液能提高土壤 pH 值和有机质、速效氮、速效磷、速效钾质量分数,并能显著提高土壤细菌数量,复合微生物肥料对提高林地土壤有机质和有效养分效果最好,显著提高土壤真菌丰度,短期提高土壤细菌数量,因此菌液、复合微生物肥和石灰石粉可明显改良山核桃林地土壤化学性状和提高土壤有益菌数量,可作为山核桃林地土壤改良剂。

## 5 参考文献

- [1] 杨旺. 森林病理学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996.
- [2] 李大勇. 山核桃干枯病的病原鉴定及野外防治的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.  
LI Dayong. *Studies on Identification and Field Control of Chinese Hickory Dry Disease* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.
- [3] 王璇, 马良进, 吕全, 等. 山核桃干腐病病原菌的鉴定[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(2): 238 - 245.  
WANG Xuan, MA Liangjin, LÜ Quan, et al. Identification of pathogens causing stem canker on *Carya cathayensis*. [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2014, **31**(2): 238 - 245.
- [4] ZHANG Chuangqing, XU B C. First report of canker on pecan (*Carya cathayensis*) caused by botryosphaeria dothidea in China [J]. *Plant Dis*, 2011, **95**(10): 1319.
- [5] 吴小芹, 何月秋, 刘忠华. 葡萄座腔菌属所致树木溃疡病发生与研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2001, **25**(1): 61 - 66.  
WU Xiaoqin, HE Yueqiu, LIU Zhonghua. Occurrence and progress on tree cankers caused by *Botryosphaeria* spp. [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2001, **25**(1): 61 - 66.
- [6] 丁世民, 李寿冰, 赵庆柱. 杨树溃疡病的发生与防治[J]. 广西植保, 2004, **17**(1): 23 - 24.  
DING Shimin, LI Shoubing, ZHAO Qingzhu. Occurrence and control of poplar canker [J]. *Plant Prot Guangxi*, 2004, **17**(1): 23 - 24.



- [7] 王海斌, 叶江华, 陈晓婷, 等. 连作茶树根际土壤酸度对土壤微生物的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22**(3): 480 – 485.  
WANG Haibin, YE Jianghua, CHEN Xiaoting, *et al.* Effect on soil microbes of the rhizospheric soil acidity of tea tree continuous cropping [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, **22**(3): 480 – 485.
- [8] 耿士均, 王波, 刘刊, 等. 专用微生物肥对不同连作障碍土壤根际微生物区系的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, **28**(4): 758 – 764.  
GENG Shijun, WANG Bo, LIU Kan, *et al.* Effect of specific microbial fertilizer on the rhizosphere microbial flora of different continuous cropping obstacles soil [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2012, **28**(4): 758 – 764.
- [9] 陈绍荣, 余根德, 白云飞, 等. 土壤酸化及酸性土壤调理剂应用概述[J]. 化肥工业, 2013, **40**(2): 66 – 68.  
CHEN Shaorong, YU Gende, BAI Yunfei, *et al.* Introduction to soil acidification and use of conditioners on acid soil [J]. *Chem Fert Ind*, 2013, **40**(2): 66 – 68.
- [10] 刘来. 连作土壤酸化及改良对土壤性状和辣椒生理代谢的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.  
LIU Lai. *Effect of Continuous Cropping on Properties of Soil and Growth Physiological Metabolism of Pepper* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [11] 郭红伟. 连作对土壤性状和辣椒生育、生理代谢的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.  
GUO Hongwei. *Effect of Continuous Cropping on Physicochemical Properties of Soil* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [12] 董艳, 董坤, 鲁耀, 等. 设施栽培对土壤化学性质及微生物区系的影响[J]. 云南农业大学学报, 2009, **24**(3): 418 – 424.  
DONG Yan, DONG Kun, LU Yao, *et al.* Influence of greenhouse cultivation on soil chemical properties and microbial community [J]. *J Yunnan Agric Univ*, 2009, **24**(3): 418 – 424.
- [13] 钟子楠, 李淑芹, 闫爱博, 等. 碱石灰改良酸土对大豆植株保护系统的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, **40**(1): 46 – 48.  
ZHONG Zinan, LI Shuqin, YAN Aibo, *et al.* Effect of alkaline lime on soybean protection system [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2009, **40**(1): 46 – 48.
- [14] 杨星. 4 种促生抗病微生物的推广应用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.  
YANG Xing. *Study on the Popularization and Application of Four Kinds of Health-promoting and Disease-resistant Microorganisms* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2017.
- [15] 黄新琦. 生物有机肥防控黄瓜土传立枯病效果及防控机理[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.  
HANG Xinqi. *The Effects and Mechanisms of Bio-Organic Fertilizers on Biological Control of Cucumber Rhizoctonia Damping-off Disease* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [16] 朱双杰, 高智谋. 木霉对植物的促生作用及其机制[J]. 菌物研究, 2006, **4**(3): 107 – 111.  
ZHU Shuangjie, GAO Zhimou. Advancement on the *Trichoderma* promotion to plant growth and its mechanism [J]. *J Fungal Res*, 2006, **4**(3): 107 – 111.
- [17] HARMAN G, HOWELL C R, VITERBO A, *et al.* *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(1): 43 – 56.
- [18] 谢丽华, 高虹, 陈明丽, 等. 枯草芽孢杆菌 sb-24 对尖孢镰刀菌拮抗机理[J]. 土壤与作物, 2015, **4**(2): 91 – 95.  
XIE Lihua, GAO Hong, CHEN Mingli, *et al.* Antagonistic mechanism of *Bacillus subtilis* strain SB-24 on *Fusarium oxysporum* [J]. *Soil Crop*, 2015, **4**(2): 91 – 95.
- [19] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 2 版. 北京: 农业出版社, 1981.
- [20] 赵天心, 毛新伟, 程敏, 等. 毛竹种植对土壤细菌和真菌群落结构及多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2017, **28**(11): 3740 – 3750.  
ZHAO Tianxin, MAO Xinwei, CHENG Min, *et al.* Effects of *Phyllostachys edulis* cultivation on soil bacterial and fungal community structure and diversity [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2017, **28**(11): 3740 – 3750.
- [21] 余晓. 土壤微生物性质及植物营养生理状况与山核桃干腐病的关系及其调控措施[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.  
YU Xiao. *The Relationship between Soil Microbial, Plant Nutrition, Plant Physiological Characters and *Carya cathayensis* Canker Disease besides Its Manage Measures* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017.

- [22] BELL T, AGRE D, SONG J I, *et al.* Larger islands house more bacterial taxa [J]. *Science*, 2005, **308**(5730): 1884. doi: 10.1126/science.1111318.
- [23] RECHE I, PULIDOVILLENA E, BAQUEROR M, *et al.* Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness [J]. *Ecology*, 2005, **86**(7): 1715 – 1722.
- [24] VAINIO E J, HANTULA J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA [J]. *Mycol Res*, 2000, **104**(8): 927 – 936.
- [25] YU Zhongtang, MORRISON M. Comparisons of different hypervariable regions of RRS genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(8): 4800 – 4806.
- [26] WHELAN J A, RUSSELL N B, WHELAN M. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR [J]. *J Immunol Methods*, 2003, **278**(1/2): 261 – 269.
- [27] 张金屯. 数量生态学[D]. 2版. 北京: 科学出版社, 2011.
- [28] 赵秉强, 张福锁, 廖宗文, 等. 我国新型肥料发展战略研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, **10**(5): 536 – 545.  
ZHAO Bingqiang, ZHANG Fushuo, LIAO Zongwen, *et al.* Research on development strategies of fertilizer in China [J]. *Plant Nut Fert Sci*, 2004, **10**(5): 536 – 545.
- [29] 逢焕成, 李玉义, 严慧峻, 等. 微生物菌剂对盐碱土理化和生物性状影响的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, **28**(5): 951 – 955.  
PENG Huancheng, LI Yuyi, YAN Huijun, *et al.* Effects of inoculating different microorganism agents on the improvement of salinized soil [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2009, **28**(5): 951 – 955.
- [30] HÜTTL R, SCHNEIDER B U. Forest ecosystem degradation and rehabilitation [J]. *Ecol Eng*, 1998, **10**(1): 19 – 31.
- [31] 孟赐福, 水建国. 施用石灰石粉对红壤酸度和作物产量的影响[J]. 科技通报, 1988, **4**(2): 43 – 45, 40.  
MENG Cifu, SHUI Jianguo. Effects of limestone powder application on red soil acidity and crop yield [J]. *Bull Sci Technol*, 1988, **4**(2): 43 – 45, 40.
- [32] 辜运富, 云翔, 张小平, 等. 不同施肥处理对石灰性紫色土微生物数量及氨氧化细菌群落结构的影响[J]. 中国农业科学, 2008, **41**(12): 4119 – 4126.  
GU Yunfu, YUN Xiang, ZHANG Xiaoping, *et al.* Effect of different fertilizer treatments on soil microbes and ammonium oxidizing bacterial community in a calcareous purple paddy soil [J]. *Sci Agric Sin*, 2008, **41**(12): 4119 – 4126.
- [33] 胡可, 王曰鑫, 王利宾. 生物菌剂与腐植酸肥配施对模拟复垦土壤的微生物数量和作物养分含量影响的研究[J]. 腐植酸, 2012(3): 18 – 21.  
HU Ke, WANG Yuexin, WANG Libin. The effect of mixed microbial agent and humic acid fertilizer on microorganism numbers and nutrient content of plant in simulated reclaimed soil [J]. *Humic Acid*, 2012(3): 18 – 21.
- [34] 康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清, 等. 哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用[J]. 农药, 2013, **52**(2): 128 – 131.  
KANG Pingzhi, ZHANG Lirong, SHEN Ruiqing, *et al.* Ecological effect of *Trichoderma harzianum* preparation on rhizosphere soil microbes in facilities continuous cropping tomato and their disease prevention [J]. *Agrochemicals*, 2013, **52**(2): 128 – 131.
- [35] 孙冬晔. 施肥措施对红壤性水稻土可溶性有机碳组成及生物有效性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.  
SUN Dongye. *Effect of Dertilization Practice on the Constitution and Bioavailability of Dissolved Organic Carbon in Red Paddy Soil* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [36] 焦晓丹, 吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展[J]. 土壤通报, 2004, **35**(6): 789 – 792.  
JIAO Xiaodan, WU Fengzhi. Advances in research methods of soil microbial diversity [J]. *Chin J Soil Sci*, 2004, **35**(6): 789 – 792.
- [37] 高雪莲, 邓开英, 张鹏, 等. 不同生物有机肥对甜瓜土传枯萎病防治效果及对根际土壤微生物区系的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, **35**(6): 55 – 60.  
GAO Xuelian, DENG Kaiying, ZHANG Peng, *et al.* Effects of different bio-organic fertilizers on fusarium wilt control and on the rhizosphere microbial community with muskmelon [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2012, **35**(6): 55 – 60.
- [38] WESTPHAL A, BECKER J O. Components of soil suppressiveness against *Heterodera schachtii* [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, **33**(1): 9 – 16.

- [39] 龚明福, 贺江舟, 孙晓棠, 等. 土壤微生物与土壤抑病性形成关系研究进展[J]. 新疆农业科学, 2007, **44**(6): 814 – 819.  
GONG Mingfu, HE Jiangzhou, SUN Xiaotang, *et al.* Research on the relationship between soil microbes and soil disease suppression [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 2007, **44**(6): 814 – 819.
- [40] 胡可, 王琳, 秦俊梅. 菌肥与有机无机肥配施对石灰性土壤生化作用强度和微生物数量的影响[J]. 河南农业科学, 2015, **44**(10): 76 – 80.  
HU Ke, WANG Lin, QIN Junmei. Effect of combined application of microbial fertilizer and organic-chemical fertilizer on biochemical action intensity and microbe quantity of calcareous soil [J]. *J Henan Agric Sci*, 2015, **44**(10): 76 – 80.
- [41] 游偲, 张立猛, 计思贵, 等. 枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落的影响[J]. 应用生态学报, 2014, **25**(11): 3323 – 3330.  
YOU Cai, ZHANG Limeng, JI Sigui, *et al.* Impact of biocontrol agent *Bacillus* on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2014, **25**(11): 3323 – 3330.
- [42] 聂鑫. 生防菌荧光假单胞菌 CPF10 所致西瓜根围土壤中激变菌株的功能分析[D]. 上海: 华东理工大学, 2017.  
NIE Xin. *Assessing the Impact Bicontrol Agent Pseudomonas fluorescens CPF10 on the Fungal Community Diversity in Soil of Watermelon* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017.
- [43] 李朔. 利用 dgge 法研究微生物肥料培养过程中菌群的变化[D]. 北京: 北京化工大学, 2012.  
LI Shuo. *The Culture of Function Bacteria and Bacteria Colony's Change in Compound Microorganism Fertilizer by DGGE* [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2012.
- [44] 吴恩彪. 微生物肥料对云烟 87 根系生长及其根际土壤细菌群落多样性影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.  
WU Enbiao. *The Influence of Microbial Fertilizer on Bacterial Community Diversity of Rhizosphere Soil and Root Growth of Yunnan Tobacco 87* [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2015.