

研究报告



枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜根区土壤微生物生态的影响

王超 李刚 黄思杰 张弛 田伟 田然 王磊 席运官*

环境保护部南京环境科学研究所 江苏 南京 210042

摘要:【背景】微生物肥料已广泛应用于我国有机作物的种植,其对有机种植土壤微生物生态的影响尚需科学评测。【目的】高通量测序技术可用于精确分析土壤微生物群落,从细菌、真菌群落结构和多样性的角度阐释枯草芽胞杆菌菌肥对有机农田根区土壤微生物群落的影响。【方法】在有机农田轮作种植条件下,施用枯草芽胞杆菌菌肥后提取冬瓜根区土壤基因组 DNA,通过 PCR 扩增建立文库,利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,并结合相关生物信息学方法分析土壤细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区和真菌 ITS1 区的多样性指数及群落结构;测定根区土壤化学性质及酶活性,分析有机冬瓜果实品质,并作相关分析。【结果】从 6 个有机冬瓜根区土壤样本中获得 14 199 个细菌操作分类单元(OTU)和 3 378 个真菌 OTU,细菌和真菌文库测序覆盖率分别在 98%、99%以上。枯草芽胞杆菌菌肥会在一定程度上提高土壤细菌种群多样性而降低真菌种群多样性,丰富了细菌群落结构,但显著降低了真菌群落丰富度($P<0.05$);并减少了根区土壤特有细菌和真菌物种。变形菌门、厚壁菌门和放线菌门是优势细菌,子囊菌门是优势真菌;枯草芽胞杆菌菌肥会提高绿弯菌门和子囊菌门的相对丰度,比例分别为 46.23%、10.01%;降低变形菌门和担子菌门的相对丰度,比例分别为 11.14%、74.72%。枯草芽胞杆菌菌肥显著降低了土壤 pH,显著提高了有机冬瓜果实总氨基酸、可溶性固形物等营养成分含量($P<0.05$)。【结论】施用枯草芽胞杆菌菌肥改变有机冬瓜根区土壤细菌和真菌的丰富度和多样性,降低了土壤 pH,提高了有机冬瓜果实品质。

关键词: 枯草芽胞杆菌菌肥, 冬瓜, 根区土壤, Illumina MiSeq 高通量测序, 细菌群落, 真菌群落

Effect of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer on root-zone soil microbial ecology of organic Chinese watermelon

WANG Chao LI Gang HUANG Si-Jie ZHANG Chi TIAN Wei TIAN Ran
WANG Lei XI Yun-Guan*

Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing, Jiangsu 210042, China

Abstract: [Background] Microbial fertilizers have been widely used in the cultivation of organic crops in China, and their effects on the micro-ecology in soils of organic farm still needs scientific evaluation. [Objective] The high-throughput sequencing technology can be used to analyze soil microbial community accurately. We explained effects of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer on organic farm root-zone soil

Foundation items: The Fundamental Research Funds for Central Public Welfare Research Institutes (GYZX170307); The Public Welfare Research Funds for Environmental Protection of Yunan Province (45012)

*Corresponding author: E-mail: xygofrcc@126.com

Received: 09-03-2018; Accepted: 17-04-2018; Published online: 28-08-2018

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(GYZX170307); 云南省环保公益专项(45012)

*通信作者: E-mail: xygofrcc@126.com

收稿日期: 2018-03-09; 接受日期: 2018-04-17; 网络首发日期: 2018-08-28

bacterial and fungal community in the view of structure and diversity. **[Methods]** Under organic and rotate farming conditions, soil genomic DNA was extracted after application of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer. And PCR amplification was made to establish libraries. Then, the 16S rRNA genes V3–V4 regions of soil bacterium and fungal ITS1 regions were sequenced by Illumina high-throughput sequencing technology on MiSeq platform, and related biological analysis was conducted to explain the changes of soil bacterial and fungal diversities and structures. In addition, soil chemical properties and enzyme activities, nutritional quality of organic Chinese watermelon were determined. **[Results]** A total of 14 199 bacterial operational taxonomic units (OTUs) and 3 378 fungal OTUs were obtained from 6 organic Chinese watermelon root-zone soil samples. The sequencing coverage of bacterial and fungal libraries were above 98% and 99%, respectively. *Bacillus subtilis* microbial fertilizer would increase the soil bacterial diversity while reduce the fungal diversity to a certain degree, and increased the abundance of bacteria, but it reduced the abundance of fungi significantly ($P < 0.05$), and reduced the number of bacterial and fungal unique OTU. *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* were the dominant bacteria, and *Ascomycota* was dominant fungi. It increased the relative abundance of Chloroflexi and Ascomycota by 46.23% and 10.01%, respectively. And, it reduced the relative abundance of *Proteobacteria* and *Basidiomycota* by 11.14% and 74.72%, respectively. It significantly reduced the pH of soil ($P < 0.05$). Wherein, it significantly increased the content of total amino acids and soluble solid in organic Chinese watermelon ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The abundance and diversity of soil bacteria and fungi were changed with *Bacillus subtilis* microbial fertilizer applied. And soil pH was reduced, nutritional quality of organic Chinese watermelon was increased also.

Keywords: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer, Chinese watermelon, Root-zone soil, Illumina MiSeq high-throughput sequencing, Bacterial community, Fungal community

健康的土壤是农业种植生产的基础,通过施肥培育健康土壤、提升土地质量是当前我国农业种植生产中提高作物产量和品质的关键环节。相较于常规农业中化学肥料的大量使用,施用生物有机肥及微生物肥料是当前有机种植生产中改良土壤、增加土壤肥力的重要手段。微生物肥料含有特定功能的微生物,可以调控农作物的生长发育,减少或降低作物病虫害的发生,改善农产品品质^[1]。近年来,我国微生物肥料产业发展快速,截至2016年7月,农业部登记的微生物肥料产品达到2 780个,年产量已突破1 000万t,应用面积超过1 333万hm²^[2]。与之相对应的是有机作物种植面积快速增长,截至2015年底,我国有机植物生产面积为222.4万hm²,有机生产面积已达全国农业耕地面积的0.77%^[3]。随着我国有机作物种植面积不断增长,必将大量施用微生物肥料,然而其在提升有机种植耕作层土壤质量中的作用尚缺乏明确的科学依据。微生物肥料可分为根瘤肥料、固氮菌肥料、硅酸盐细菌肥料、磷细菌肥料和复合微生物肥料,有效活菌数要

求 ≥ 1 亿/mL^[1]。田间施用微生物肥料会将大量微生物引入土壤局部区域,对有机种植土壤中原有的微生物群落造成影响,甚至会破坏土壤微生态平衡。因此,需要科学评测微生物肥料对有机农田土壤微生物群落的影响。

高通量测序技术是目前应用最普遍的新一代测序技术,与传统的琼脂培养基培养、Biolog平板法、磷脂脂肪酸、PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)和RFLP (Restriction fragment length polymorphism)等分析方法相比,具有高通量、高灵敏度、高准确性和低运行成本等特点,通过检测土壤微生物细胞内特定遗传物质(原核微生物16S rRNA、真核微生物18S rRNA)的碱基序列,可以更全面、准确地揭示土壤中微生物群落的复杂性和多样性,已广泛应用于土壤微生物群落的研究^[4-6]。本研究基于Illumina新一代MiSeq平台的高通量测序技术,结合相关生物信息学方法,全面分析土壤细菌16S rRNA基因V3–V4区和真菌ITS1区的多样性指数及群落结构,

旨在研究江苏省仪征市有机农田轮作种植条件下, 枯草芽胞杆菌菌肥对有机农田根区土壤微生物多样性和群落结构的影响, 并结合土壤化学性质、酶活性以及有机冬瓜果实品质做相关分析, 以期科学反映施用枯草芽胞杆菌菌肥对有机种植土壤健康的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

田间试验选址在江苏省仪征江扬生态农业有限公司四庄基地有机蔬菜田(119°7'4.3"E, 32°22'59.8"N), 土壤类型为潮土, 年平均气温 15.3 °C, 年日照时数 2 054.1 h, 无霜期 224 d, 年均降水量约 994 mm。种植前采样分析测定试验田 0–20 cm 土壤基本性质: pH 6.59, 铵态氮 12.67 mg/kg, 速效磷 20.33 mg/kg, 速效钾 201.06 mg/kg, 有机质 33.27 g/kg, 过氧化氢酶 10.16 U/g, 蔗糖酶 15.67 U/g, 脱氢酶 271.91 U/g, 脲酶 1 330.98 U/g, 酸性磷酸酶 17.42 U/g。

1.2 试验设计

以枯草芽胞杆菌菌肥为微生物肥料研究对象, 由南京农大生物源农药创制有限公司提供, 已通过南京国环有机产品认证中心有机农业生产资料评估(证明号: IP-0109-932-1696), 广泛应用于江苏等地区有机种植生产。登记证号: 微生物肥(2013)准字(1096)号, 有效菌种为枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*), 有效活菌数 ≥ 2.0 亿/mL, pH 3.5–5.0。

试验于 2017 年 5 月至 10 月进行。试验采用随机区组设计, 共设置 2 个处理, 分别为枯草芽胞杆菌菌肥处理(N)和对照(C), 每个处理设置 3 个重复, 共 6 个小区, 每个小区面积 30 m² (3 m×10 m), 保护行宽为 1 m, 走道宽及小区间排水沟宽均为 0.5 m。试验作物为冬瓜 [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.], 前茬作物为青菜 (*Brassica chinensis* L.), 轮作模式为“青菜-冬瓜-蒜”。枯草芽胞杆菌菌肥处理组于冬瓜定植后和开花期分别根部施用 200 倍稀释液, 对照组施用等量灌溉水。田间管理及有害生物防治采取有机种植模式。

1.3 样品采集

土壤样品采集于第一次盛花期进行, 用土壤采样器钻取各处理小区 0–20 cm 根区土壤, 按照“S”形多点取样, 每小区 6 钻, 去除根系、杂草、土壤动物和石块等杂质后充分混匀作为 1 个根区土壤样品, 采用四分法平均分成 2 份, 低温保存带回分别置于–80 °C 和–20 °C 备用。

采集第二批进入成熟期的冬瓜果实作为有机冬瓜样品, 每个处理随机选取 3 个果实进行品质测定。

1.4 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 土壤 DNA 提取试剂盒, Omega 公司; DNA 凝胶回收纯化试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 土壤酶试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

NanoDrop ND1000 紫外可见分光光度计, Thermo 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; AA3 连续流动分析仪, 哈尔滨德远科技开发有限公司; 电泳仪, 北京市六一生物技术有限公司; 超低温冰箱, 南京惠恒科学仪器有限公司。

1.5 土壤性质测定

土壤样品经自然风干、研磨过筛(1 mm)后, 参照文献[7]方法测定土壤的理化性质。pH 使用 pH 计测定(土水比 1:5); 氨态氮测定时将土壤样品经浓度为 0.5 mol/L 的 K₂SO₄ 溶液浸提 1 h 后, 用连续流动分析仪测定; 速效磷采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提-分光光度法测定; 速效钾采用 1 mol/L NH₄Ac 浸提-火焰光度法测定; 有机质采用油浴外加热-K₂Cr₂O₇ 容量法测定。土壤过氧化氢酶、蔗糖酶、脱氢酶、脲酶和酸性磷酸酶活性分别使用土壤酶试剂盒测定。

1.6 土壤微生物总 DNA 提取和高通量测序

提取土壤微生物总 DNA, 测定 DNA 浓度, 并经 2% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 样品进行检测, 合格后用于构建文库; 以各土壤样品微生物总 DNA 为模板, 以细菌 V3–V4 区(338F: 5'-ACTCCTACGGG AGGCAGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3')^[8]和真菌 ITS1 区(ITS1F: 5'-CTTGGTC ATTTAGAGGAAGTAA-3'; 2043R: 5'-GCTGCGTT

CTTCATCGATGC-3')^[4]特异性引物为扩增引物进行融合引物 PCR。PCR 反应体系(25 μ L): Q5 Reaction buffer (5 \times) 5.0 μ L, Q5 GC High enhancer (5 \times) 5.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.00 μ L, 模板 (0.2 ng/ μ L) 1.0 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L)各 1.0 μ L, Q5 Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 灭菌超纯水 9.75 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。采用 Illumina MiSeq 测序平台对 PCR 扩增产物进行双端测序分析, 测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.7 有机冬瓜品质测定

游离氨基酸含量测定参照 GB/T 5009.124-2016^[9]; 可溶性固形物含量测定参照 NY/T 2637-2014^[10]; 可溶性总糖含量测定参照 NY/T 1278-2007^[11]; 总酸度测定参照 GB/T 12456-2008^[12]; 糖酸比以可溶性总糖含量与总酸度的比值表示; 蛋白质含量测定参照 GB 5009.5-2016^[13]; 粗纤维含量测定参照 GB/T 5009.10-2003^[14]; 维生素 C 含量测定参照 GB/T 5009.86-2016^[15]; 硝酸盐含量测定参照 GB 5009.33-2016^[16]。

1.8 数据处理与分析

土壤理化性质、土壤酶活性及有机冬瓜品质数据采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据整理和图表制作, 用 DPS 7.05 进行方差分析(LSD 法), 显著性水平设定为 $P=0.05$ 。

测序数据经 FLASH^[17]和 Trimmomatic^[18]软件进行过滤优化和双端序列的连接, 优质序列利用 USEARCH 软件基于 97%的相似水平上进行 OTU

(Operational taxonomic unit)聚类, 根据 Silva 细菌数据库^[19]和 Unite 真菌数据库利用 RDP Classifier 进行物种注释和分类^[20]; 基于 OTU 丰度信息, 利用 R 语言工具制作稀释曲线(Rarefaction curve)、Venn 图和群落柱形图, 利用 Mothur 软件计算 α -多样性指数(Shannon、Simpson、Chao1、ACE)^[5,21], 并用 Excel 和 DPS 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌和真菌文库测序结果评价

对 6 个土壤样品进行了 Illumina MiSeq 高通量测序, 数据经过滤优化, 细菌文库共得到 260 459 条有效序列, 序列长度分布在 267–493 bp 之间, 97% 相似水平下聚类获得 14 199 个 OTU; 真菌文库共得到 336 765 条有效序列, 序列长度分布在 204–410 bp 之间, 97%相似水平下聚类获得 3 378 个 OTU; 每个样品的有效序列数量和 OTU 数量如表 1 所示, 处理组(N)和对照组(C)细菌文库的有效序列数和 OTU 数差异不显著, 处理组(N)真菌文库的有效序列数和 OTU 数均显著低于对照组(C) ($P<0.05$)。

稀释曲线反映了样品文库测序数据量的合理性, 可用于评价测序数据量能否覆盖所有类群。细菌和真菌多样性稀释曲线(图 1)显示, 随着测序量的不断增大, 各样品 OTU 数目的增加趋于平缓, 基本达到饱和, 说明测序数据量合理; 在 97%相似水平上计算各土壤样品测序的覆盖率(表 2), 细菌文库测序覆盖率在 98%以上, 真菌文库测序覆盖率在 99%以上, 说明取样合理, 处理

表 1 有机冬瓜盛花期根区土壤细菌、真菌 OTU 序列读数

Table 1 Reads of bacterial and fungal OTUs from organic Chinese watermelon root-zone soil at flowering period

Treatments	Bacterial (V3–V4)		Fungal (ITS1)	
	Sequence number	OTUs number (97%)	Sequence number	OTUs number (97%)
C	43 131.0 \pm 1 790.7a	2 373.0 \pm 234.1a	61 080.0 \pm 3 945.4a	631.0 \pm 101.6a
N	43 689.0 \pm 5 658.7a	2 360.0 \pm 219.8a	51 175.0 \pm 2 956.0b	495.0 \pm 83.4b

注: N: 枯草芽孢杆菌菌肥处理; C: 对照。数值为平均值 \pm 标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).
Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C). The data are the averages \pm SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

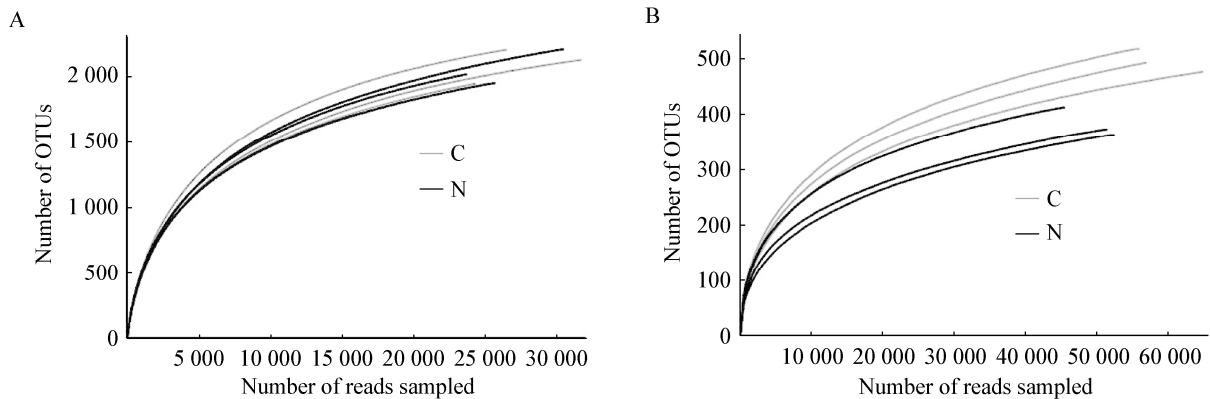


图 1 有机冬瓜盛花期根区土壤样品细菌(A)、真菌(B)多样品稀释曲线

Figure 1 Bacterial (A) and fungal (B) rarefaction curves of organic Chinese watermelon root-zone soil samples at flowering period

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照.

Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C).

表 2 有机冬瓜盛花期根区土壤细菌、真菌群落丰富度和多样性指数

Table 2 The bacterial and fungal OTUs' abundance and diversity of organic Chinese watermelon root-zone soil samples at flowering period

Treatments	Bacterial (V3-V4)					Fungal (ITS1)				
	Shannon index	Simpson index	ACE index	Chao1 index	Coverage (%)	Shannon index	Simpson index	ACE index	Chao1 index	Coverage (%)
C	6.340±	0.005 9±	2 464.50±	2 457.30±	0.981 9±	3.220±	0.089 2±	624.70±	628.50±	0.997 7±
	0.118a	0.000 8a	88.63a	77.71a	0.003 1a	0.134a	0.011 5a	26.34a	39.44a	0.000 3a
N	6.390±	0.004 5	2 485.80±	2 506.70±	0.980 2±	3.020±	0.106 9±	502.00±	503.20±	0.997 8±
	0.050a	±0.000 8a	130.31a	141.99a	0.002 0a	0.324a	0.044 7a	20.96b	14.62b	0.000 2a

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照. 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P < 0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).

Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C). The data are the averages±SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P < 0.05$.

组间细菌和真菌文库测序覆盖率差异不显著。因此, 测序数据能够真实地反映土壤样品中的细菌和真菌群落, 但可能仍有少量细菌和真菌种类未被发现。

2.2 枯草芽胞杆菌菌肥对根区土壤细菌和真菌群落丰富度和多样性的影响

Shannon 和 Simpson 指数用于反映土壤样品中微生物的多样性, 前者数值越大表明群落多样性越高; 后者数值越大表明群落多样性越低^[22]。表 2 数据显示, 施用枯草芽胞杆菌菌肥后, 有机冬瓜根区土壤细菌 Shannon 指数提高, Simpson 指数下降,

幅度分别为 0.72% 和 23.54%, 与对照组差异不显著; 土壤真菌 Shannon 指数下降, Simpson 指数提高, 幅度分别为 6.06% 和 19.86%, 与对照组差异不显著。可见, 有机冬瓜根区土壤施用枯草芽胞杆菌菌肥会在一定程度上提高土壤细菌种群多样性而降低真菌种群多样性。

ACE 和 Chao1 指数可反映群落物种丰富度, 由表 2 数据可知, 有机冬瓜根区土壤细菌 ACE 和 Chao1 指数在施用枯草芽胞杆菌菌肥后上升, 上升幅度分别为 0.86% 和 2.01%, 与对照组差异不显著; 与对照组相比, 施用枯草芽胞杆菌菌肥显著降低真

菌的ACE和Chao1指数,分别降低19.64%、19.93%。结果表明,有机冬瓜根区土壤施用枯草芽胞杆菌菌肥在一定程度上丰富了细菌群落结构,但降低了真菌群落丰富度。

2.3 施用枯草芽胞杆菌菌肥后根区土壤细菌和真菌类群分析

在97%的相似度下,对照组(C)和处理组(N)土壤样品分别得到2 373和2 360个细菌OTU(平均值),差异不显著;得到631和495个真菌OTU(平均值),对照组(C)显著高于处理组(N)(表1)。可见,枯草芽胞杆菌菌肥在一定程度上降低了根区土壤细菌和真菌类群的特异性。

Venn图直观展现并反映组间或样品之间OTU数目组成相似性、重叠情况以及特异性^[23]。由图2A可知,对照组(C)和处理组(N)之间共有的细菌OTU数目为2 412个,代表的物种分别属于 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、芽胞杆菌纲(*Bacilli*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、酸杆菌纲(*Acidobacteria*)和芽单胞菌纲(*Gemmatimonadetes*)等(占比超过5%的纲)。对照组(C)和处理组(N)特有的OTU数分别为202、184个,说明施用枯草芽胞杆菌菌肥会减少根

区土壤特有细菌物种。对OTU在科分类水平上分析发现,对照组(C)特有19个科的细菌,除未分类的菌群外,包括*Thermoanaerobacteraceae*和梭菌科(*Clostridiaceae*),丰度占比分别为4.94%和3.70%;处理组(N)特有13个科的细菌,除未分类的菌群外,包括血杆菌科(*Sanguibacteraceae*)、链球菌科(*Streptococcaceae*)、*Thermosporotrichaceae*和*Geobacteraceae*等,丰度占比分别为29.82%、17.54%、7.02%和3.51%。

从图2B中可以看出,对照组(C)和处理组(N)共有的真菌OTU数目为492个,主要共有物种分别属于粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)、盘菌纲(*Pezizomycetes*)和散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)等(占比超过5%的纲)。对照组(C)和处理组(N)特有的OTU数分别为252、95个,说明施用枯草芽胞杆菌菌肥会减少根区土壤特有真菌物种。对OTU在科分类水平上分析发现,对照组(C)特有18个科的真菌,除未分类的菌群外,包括晶杯菌科(*Hyaloscyphaceae*)、粪盘菌科(*Ascobolaceae*)、*Trichosporonaceae*、嗜热子囊菌科(*Thermoascaceae*)和小丛壳科(*Glomerellaceae*)等,丰度占比分别为13.86%、7.92%、2.97%、2.97%和1.98%;处理组

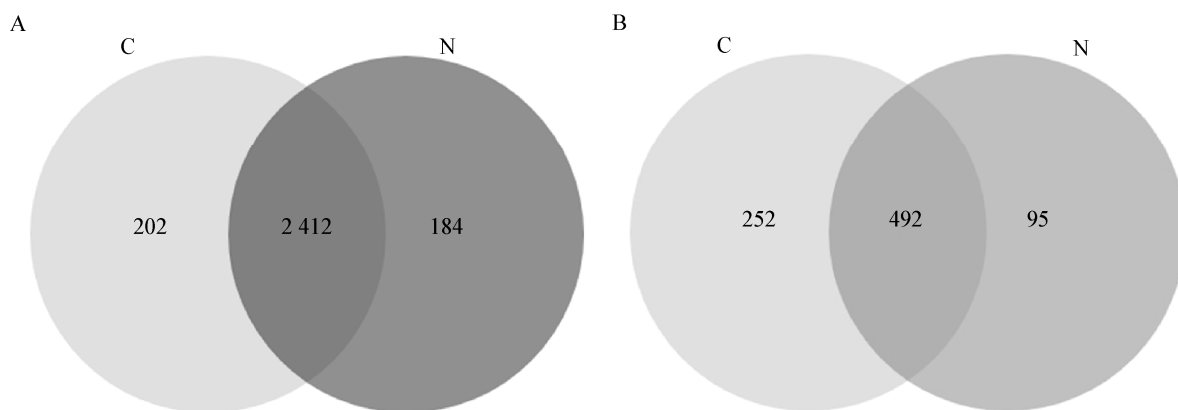


图2 有机冬瓜盛花期根区土壤细菌(A)、真菌(B)群落OTU分布的Venn分析图

Figure 2 Venn analysis for bacterial (A) and fungal (B) species (OTUs) of soil samples from the organic Chinese watermelon root-zone at flowering period

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照. 序列按相似度高于0.97进行OTU聚类。

Note: N: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated; C: Control. The sequences are clustered at OTU according to the similarity above 0.97.

(N)特有 8 个科的真菌, 除未分类的菌群外, 包括 *Leucosporidiaceae*、*Lyophyllaceae*、*Togniniaceae* 和核盘菌科(*Sclerotiniaceae*)等, 丰度占比分别为 13.46%、5.77%、1.92%和 1.92%。

2.4 枯草芽胞杆菌菌肥对根区土壤细菌和真菌群落分布特征的影响

在门分类水平上的细菌类群分布及相对丰度如图 3A 所示, 有机冬瓜根区土壤样品中的细菌包含变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等菌群, 处理组(N)和对照组(C)细菌群落组成相似; 除了未分类的其他菌群, 变形菌门、厚壁菌门和放线菌门的相对丰度最高, 属于优势细菌; 施用枯草芽胞杆菌菌肥不同程度降低了根区土壤变形菌门和厚壁菌门的相对丰度, 分别比对照组(C)降低 11.14% ($P=0.37$)、21.98% ($P=0.11$); 提高了绿弯菌门、酸杆菌门和芽单胞菌门的相对丰度, 分别比对照组(C)升高 46.23% ($P=0.02$)、34.75% ($P=0.30$)、12.29% ($P=0.48$), 其中绿弯菌门的相对丰度与对照组(C)形成显著差异。从细菌科的分类水平上看(图 3B), 除未确定科类外, 有机冬瓜根区土壤中芽胞杆菌科(*Bacillaceae*)、芽单胞菌科(*Gemmatimonadaceae*)、黄色单胞菌科(*Xanthomonadaceae*)和鞘酯菌科(*Sphingomonadaceae*)的相对丰度均最高(数值 > 3%), 属于优势细菌; 施用枯草芽胞杆菌菌肥使芽胞杆菌科和黄色单胞菌科的相对丰度分别降低了 25.33% ($P=0.06$)、17.29% ($P=0.63$), 芽单胞菌科的相对丰度升高了 11.85% ($P=0.47$)。

图 3C 为根区土壤真菌在门分类水平上的物种柱状图, 子囊菌门(*Ascomycota*)、接合菌门(*Zygomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、壶菌门(*Chytridiomycota*)等在处理组(N)和对照组(C)土壤样品中均有分布, 子囊菌门是优势菌群, 相对丰度

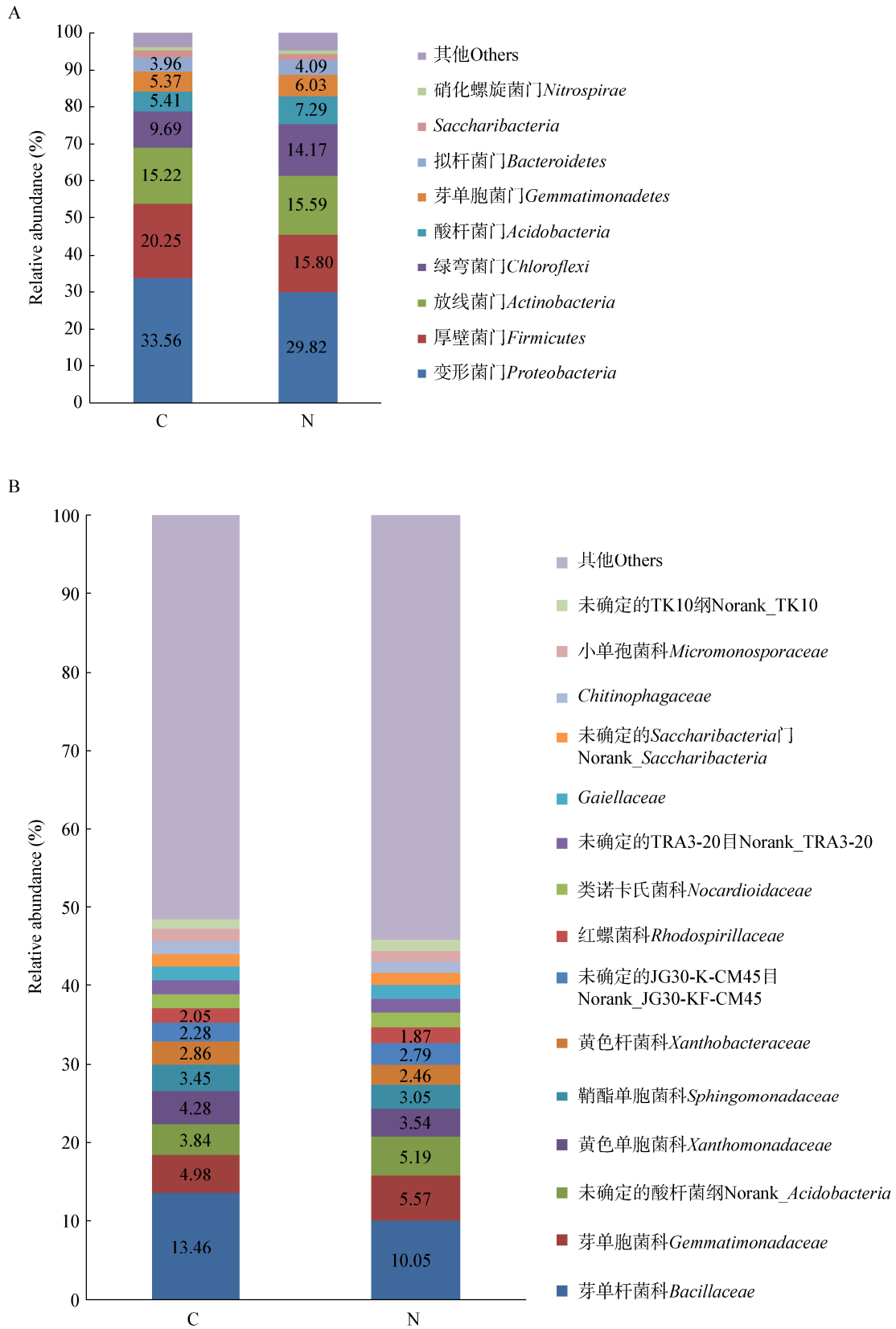
占比超过 85%; 受限于数据库的原因, 相对丰度排名第二的菌群未能分类; 施用枯草芽胞杆菌菌肥使子囊菌门的相对丰度升高 11.96% ($P=0.17$), 接合菌门和担子菌门的相对丰度分别降低 11.96% ($P=0.83$)、74.72% ($P=0.38$)。图 3D 显示, 有机冬瓜根区土壤真菌在科水平上主要包括毛壳菌科(*Chaetomiaceae*)、肉座菌科(*Hypocreaceae*)、丛赤壳科(*Nectriaceae*)、小囊菌科(*Microascaceae*)和发菌科(*Trichocomaceae*)等, 除了未确定科类的菌群外, 子囊菌门中毛壳菌科的相对丰度在处理组(N)和对照组(C)中均最大, 是优势菌群; 施用枯草芽胞杆菌菌肥提高了毛壳菌科和小囊菌科的相对丰度, 分别比对照组(C)提高 38.41% ($P=0.17$)、107.84% ($P=0.17$), 降低了肉座菌科和丛赤壳科的相对丰度, 分别比对照组(C)降低 29.80% ($P=0.48$)、24.00% ($P=0.48$)。

2.5 枯草芽胞杆菌菌肥对根区土壤化学性质及酶活性的影响

于有机冬瓜第一次盛花期测定了根区土壤化学性质及酶活性, 如表 3 所示, 处理组(N)和对照组(C)土壤铵态氮、速效钾、速效磷及有机质含量均低于种植前, 前者各项指标略低于后者, 差异不显著; 但处理组(N)土壤 pH 显著低于对照组(C) ($P<0.05$), 二者均低于有机冬瓜种植前土壤 pH。施用枯草芽胞杆菌菌肥显著提高了根区土壤过氧化氢酶及蔗糖酶活性, 对脱氢酶、脲酶和酸性磷酸酶活性影响不显著(表 4)。

2.6 枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜品质的影响

对第二批进入成熟期的有机冬瓜果实进行了营养品质指标测定分析, 如表 5 所示, 施用枯草芽胞杆菌菌肥能显著提高有机冬瓜果实总氨基酸、可溶性固形物、总糖及总酸含量[比对照组(C)分别上升 23.08%、14.11%、41.18%和 28.57%], 显著降低了蛋白质及维生素 C 含量[比对照组(C)分别下降 38.29%和 15.33%], 对硝酸盐含量影响不显著。



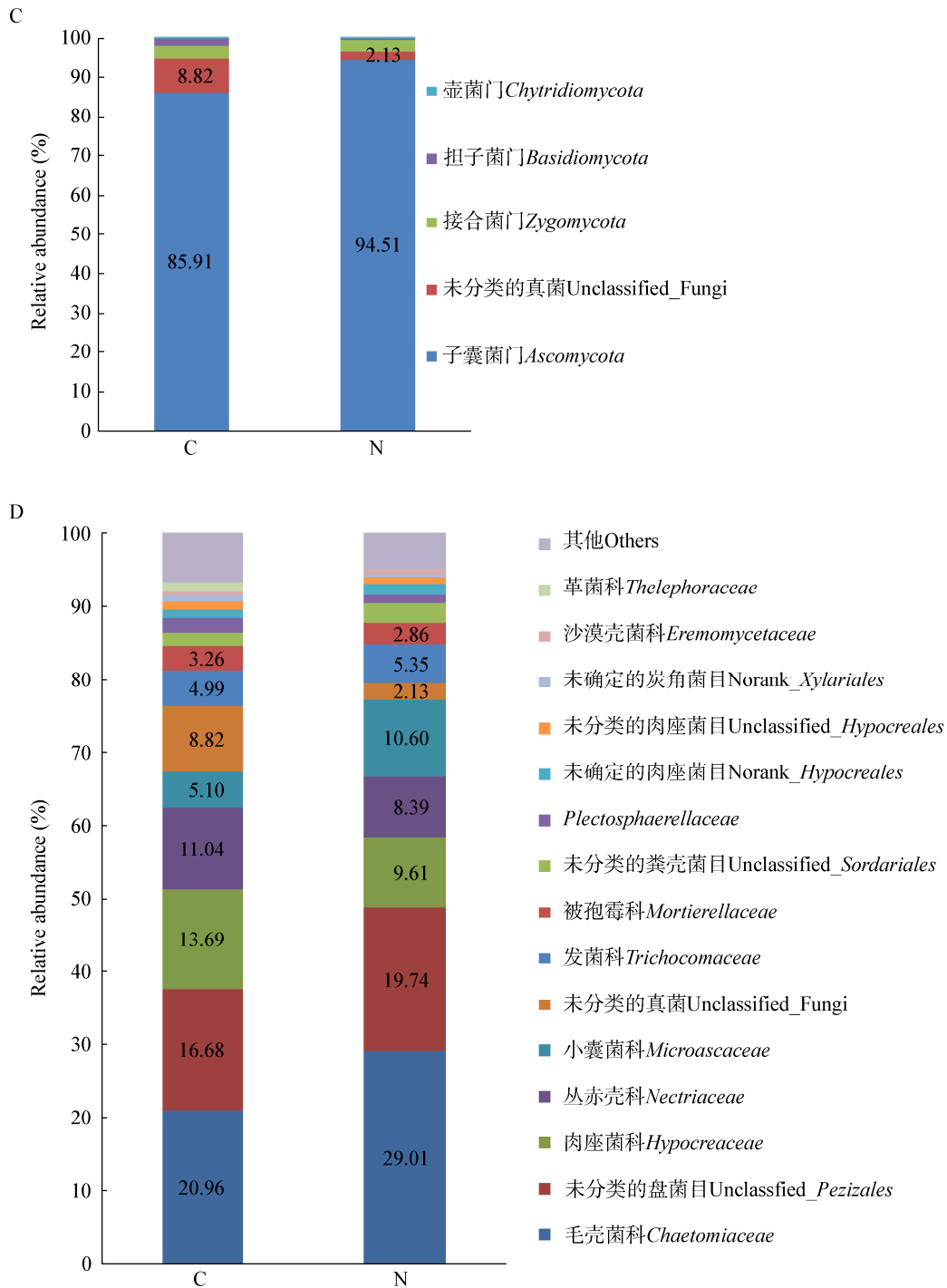


图3 有机冬瓜盛花期根区土壤细菌和真菌群落相对丰度

Figure 3 Percentage of bacterial and fungal community abundance in organic Chinese watermelon root-zone soil at flowering period

注: A: 细菌门水平; B: 细菌科水平; C: 真菌门水平; D: 真菌科水平. N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照.

Note: A: Bacterial at phylum level; B: Bacterial at family level; C: Fungal at phylum level; D: Fungal at family level. N: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated; C: Control.

表 3 枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜盛花期根区土壤化学性质的影响

Table 3 Effects of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer on chemical properties of organic Chinese watermelon root-zone soil at flowering period

处理 Treatments	pH	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	速效钾 A-K (mg/kg)	速效磷 A-P (mg/kg)	有机质 SOA (g/kg)
N	6.23±0.07b	10.17±1.11a	187.00±9.42a	17.02±2.18a	31.33±3.35a
C	6.43±0.04a	11.66±2.16a	191.33±7.73a	18.33±5.77a	31.51±1.57a

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照. 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).

Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C). The data are the averages±SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

表 4 枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜盛花期根区土壤酶活性的影响

Table 4 Effects of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer on enzyme activities in organic Chinese watermelon root-zone soil at flowering period

处理 Treatments	过氧化氢酶 Catalase (U/g)	蔗糖酶 Saccharase (U/g)	脱氢酶 Dehydrogenases (U/g)	脲酶 Urease (U/g)	酸性磷酸酶 Acid phosphatase (U/g)
N	17.15±0.55a	12.89±0.68a	249.85±4.02a	1 552.89±42.53a	13.69±0.33a
C	16.46±0.63b	10.67±0.39b	262.57±2.38a	1 550.64±34.12a	13.36±0.35a

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照. 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).

Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C). The data are the averages±SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

表 5 枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜品质的影响

Table 5 Effects of *Bacillus subtilis* microbial fertilizer on nutritional quality of organic Chinese watermelon

处理 Treatments	总氨基酸 Total amino acids (%)	可溶性固形物 Soluble solid (%)	总糖 Total sugar (%)	总酸 Total acid (%)	蛋白质 Protein (%)	维生素 C Vitamin C (mg/100 g)	硝酸盐 Nitrate (mg/kg)
N	0.160±0.003a	2.83±0.03a	0.24±0.02a	0.090±0.002a	1.08±0.10b	22.58±0.81b	858.66±16.88a
C	0.130±0.002b	2.48±0.03b	0.17±0.01b	0.070±0.002b	1.75±0.04a	26.67±1.08a	858.14±16.86a

注: N: 枯草芽胞杆菌菌肥处理; C: 对照. 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).

Note: *Bacillus subtilis* microbial fertilizer-treated (N) and control (C). The data are the averages±SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

3 讨论与结论

当前, 高通量测序技术已广泛用于土壤微生物的群落结构及多样性研究^[6]。针对外源有益微生物对有机农田土壤微生态影响的研究鲜有报道, 本研究基于 Illumina MiSeq 平台对有机冬瓜根区土壤细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区域和真菌 ITS1 区域进行高通量测序, 结合相关生物信息学方法分析发现, 枯草芽胞杆菌菌肥会提高细菌群落多样性和丰

度, 降低土壤真菌群落多样性和丰度(表 2), 与顾欣等^[24]在设施田块西瓜种植中应用菌肥的研究结果一致。基于 Silva 和 Unite 数据库分析显示, 在有机冬瓜根区土壤中, 变形菌门、厚壁菌门和放线菌门是主要细菌类群, 与 Schloss 等^[25]利用 16S rRNA 基因对农田土壤细菌进行生态学分类的结果一致; 子囊菌门是主要真菌类群, 与 Roesch 等^[26]对土壤微生物群落的研究结果一致。

α -多样性指数是有效评价土壤微生物群落多样性和物种丰富度的指标^[27], 本研究发现, 施用枯草芽胞杆菌菌肥提高了有机冬瓜根区土壤细菌多样性 Shannon 指数和丰富度 ACE、Chao1 指数(表 2), 游偲等^[28]同样发现枯草芽胞杆菌菌剂处理后的烟草根际土壤细菌多样性指数和丰富度指数均提高。大多数的植物病原菌来自于真菌, 康捷等^[29]研究发现麻山药糊头病和根茎腐病发病植株土壤真菌多样性和丰富度均高于健株, 本研究显示枯草芽胞杆菌菌肥能显著降低有机冬瓜根区土壤真菌多样性和丰富度(表 2), 表明枯草芽胞杆菌菌肥会在一定程度上减少有机农田作物受病原真菌侵害的几率。枯草芽胞杆菌是目前研究较多的生防细菌之一, 对多种植物病原菌具有抑制作用^[30], 本研究选用的枯草芽胞杆菌菌肥也已被证实对作物真菌病害具有防治效果^[31-32]。

Jones 等^[33]研究发现土壤中酸杆菌的丰度与土壤 pH 呈显著的负相关。田地等^[34]通过模拟 CO₂ 泄漏检测微生物时发现, CO₂ 泄漏土壤中酸杆菌门所占比例显著增加。本研究同样发现, 施用 pH 为酸性的枯草芽胞杆菌菌肥后, 处理组(N)根区土壤细菌酸杆菌门相对丰度比对照组(C)升高 34.75% (图 3A)。我们发现, 施用枯草芽胞杆菌菌肥后根区土壤特有的梭菌科细菌消失, 并提高了真菌子囊菌门和毛壳菌科相对丰度, 降低了担子菌门丰度(图 3C-D)。刘杰研究发现, 与连作相比, 轮作种植模式下黄瓜土壤中梭菌科细菌丰度降低^[35], 表明施用枯草芽胞杆菌菌肥与轮作对土壤微生物生态的健康调节作用相同。施用玉米秸秆生物炭后, 黄瓜结果期土壤子囊菌门毛壳菌科和小子囊菌科比例明显提高^[36], 与本研究结果一致。毛壳菌对病原菌的拮抗作用主要体现在重寄生和产生毛壳素等抗生素, 是重要的植物病害生防真菌^[37]。担子菌是真菌中最高等的, 绝大多数植物病原真菌来自担子菌门, 如丝核菌属(*Rhizoctonia*)、锈菌属(*Puccinia*)等^[38]。可见, 施用枯草芽胞杆菌菌肥有

助于控制有机农田作物病害发生。

微生物肥料富含功能微生物, 在农业中发挥着改良土壤、维持根系微生物区系平衡、提高作物品质、促进增产等作用^[1]。本研究发现枯草芽胞杆菌菌肥在一定程度上提高了土壤过氧化氢酶、蔗糖酶、脲酶和酸性磷酸酶活性(表 4), 并显著提高有机冬瓜营养品质(表 5), 但降低了土壤铵态氮、速效钾、速效磷和有机质等养分含量(表 3), 可能是由于枯草芽胞杆菌菌肥促进有机冬瓜生长引起的土壤贫瘠导致; 邢卫峰等^[39]发现枯草芽胞杆菌菌肥能够促进甜瓜生长, 提高果实可溶性固形物含量; 本研究中枯草芽胞杆菌菌肥显著提高土壤绿弯菌门物种丰度[比对照组(C)升高 46.23%]; 图 3A 同样说明了这个问题, Fierer 等^[40]发现绿弯菌是土壤中的贫营养细菌, 适应在养分贫瘠的土壤环境中生长。研究表明, 土壤微生物量关系到土壤肥力状况是否良好, 它们之间存在显著相关性^[41]。同样, 土壤酶与土壤微生物关系密切, 影响土壤微生物的因素同样影响土壤酶活性^[42]。珊丹等^[43]发现施用微生物菌肥土壤中可培养细菌、真菌菌落数量均显著高于未施肥处理($P < 0.05$), 而且细菌、真菌菌落数量与土壤蔗糖酶、脲酶、过氧化氢酶活性之间有一定的正相关性。本研究中枯草芽胞杆菌菌肥显著提高根区土壤过氧化氢酶和蔗糖酶活性, 细菌多样性和群落丰度上升, 真菌多样性和群落丰度下降, 三者之间的相关性尚需进一步探讨。

土壤微生物类群复杂, 微生物群落特征是微生物种群协同作用的结果, 不能依照单一或某几个种群的变化阐释枯草芽胞杆菌菌肥对有机农田土壤微生物群落的影响, 后续研究将进行长期定位连续观测, 并对微生物群落特征与土壤化学性质及酶活性变化等相关指标进行相关性分析, 进一步揭示其影响作用。细菌存在 16S rRNA 基因的多拷贝, 基因不同区域存在异质性, 基于 16S rRNA 基因不同区域的细菌种群多样性分析会产生不同程度的高

估, 其中 V4-V5 区域具有较广的种类覆盖度和良好的多样性深度, 能准确反映细菌群落的差异, 高估程度最低(约 3.0%)^[44-45], 本研究选取细菌多样性研究中常用的 V3-V4 区域^[46], 以最大限度降低 16S rRNA 基因组内多样性引起的 OTU 数量高估。本研究还发现根区土壤微生物中未分类或是未确定种属的物种受枯草芽孢杆菌菌肥的影响, 受限于数据库原因未能解释, 有待通过深度测序或利用其他先进手段对这些微生物进行更细致深入的分类研究。

REFERENCES

- [1] Shen DL, Li J, Jiang X, et al. GB 20287-2006 Microbial inoculants in agriculture[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006 (in Chinese)
沈德龙, 李俊, 姜昕, 等. GB 20287-2006 农用微生物菌剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [2] Xu JG, Sun T, Li S. Application of microbial fertilizers in agricultural production of China[J]. *Crops*, 2016(1): 1-6 (in Chinese)
许景钢, 孙涛, 李嵩. 我国微生物肥料的研究及其在农业生产中的应用[J]. *作物杂志*, 2016(1): 1-6
- [3] Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China and China Agricultural University. China Organic Product Certification and Organic Industry Development (2016)[M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, Standards Press of China, 2017: 1-3 (in Chinese)
国家认证认可监督管理委员会, 中国农业大学. 中国有机产品认证与有机产业发展(2016)[M]. 北京: 中国质检出版社、中国标准出版社, 2017: 1-3
- [4] Bokulich AN, Mills DA. Improved selection of internal transcribed spACer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(8): 2519-2526
- [5] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624
- [6] Lou J, Liu Y, Li Y. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(15): 256-260 (in Chinese)
楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(15): 256-260
- [7] Lu RK. The Analysis Methods of Soils and Agrochemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 107-109 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 107-109
- [8] Xu N, Tan GC, Wang HY, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 1-8
- [9] The State Food and Drug Administration of the People's Republic of China, The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.124-2016 National food safety standard: determination of amino acids in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
中华人民共和国国家食品药品监督管理总局, 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.124-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [10] The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 2637-2014 Determination of soluble solids content of fruits and vegetables: refractometer method[S]. Beijing: China Standards Press, 2014 (in Chinese)
中华人民共和国农业部. NY/T 2637-2014 水果和蔬菜可溶性固形物含量的测定折射仪法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014
- [11] The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 1278-2007 Determination of soluble sugar in vegetables and products shaffer-somogyi[S]. Beijing: China Standards Press, 2007 (in Chinese)
中华人民共和国农业部. NY/T 1278-2007 蔬菜及其制品中可溶性糖的测定铜还原碘量法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007
- [12] The State Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 12456-2008 Determination of total acid in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2008 (in Chinese)
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [13] The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.5-2016 National food safety standard: determination of protein in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [14] The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.10-2003 Determination of crude fiber in vegetable foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2003 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.10-2003 植物类食品中粗纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [15] The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.86-2016 National food safety standards: Determination of reductive-form ascorbic acid in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部. GB 5009.86-2016 食品安全国家标准

- 食品中抗坏血酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [16] The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.33-2016 National food safety standard determination of nitrite and nitrate in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部. GB 5009.33-2016 食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [17] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963
- [18] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120
- [19] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596
- [20] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [21] Pitta DW, Parmar N, Patel AK, et al. Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of Kankrej cattle[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111710
- [22] He Z, Zhao TT, Xing ZL, et al. Analysis of bacterial community composition in landfill cover soil[J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(12): 3744-3753 (in Chinese)
何芝, 赵天涛, 邢志林, 等. 典型生活垃圾填埋场覆盖土微生物群落分析[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(12): 3744-3753
- [23] Chen HB, Boutros PC. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 35
- [24] Gu X, Sun Q, Wang R, et al. Microbial fertilizer and organic fertilizer on soil improvement effect of plastic shed watermelon[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, 35(3): 219-225 (in Chinese)
顾欣, 孙权, 王锐, 等. 菌肥与有机肥配施对拱棚西瓜土壤的改良效果[J]. *干旱地区农业研究*, 2017, 35(3): 219-225
- [25] Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 686-691
- [26] Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283-290
- [27] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [28] You S, Zhang LM, Ji SG, et al. Impact of biocontrol agent *Bacillus subtilis* on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(11): 3323-3330 (in Chinese)
- 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
- [29] Kang J, Zhang SY, Han T, et al. Research on rhizosphere soil microbial diversity of two typical kinds of disease in yam[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(7): 107-113 (in Chinese)
康捷, 章淑艳, 韩韬, 等. 两种麻山药典型病害根际土壤微生物多样性的研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(7): 107-113
- [30] Dawar S, Wahab S, Tariq M, et al. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2010, 43(4): 412-418
- [31] Jiang ZQ, Guo YH, Li SM, et al. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper[J]. *Biological Control*, 2006, 36(2): 216-223
- [32] Peng Z, Wang CJ, Chen QH, et al. Effects of bio-fertilizer "Ningdun" on controlling *Phytophthora sojae* and promoting soybean growth[J]. *Acta Agricultural Shanghai*, 2014, 30(6): 95-98 (in Chinese)
彭震, 王春娟, 陈庆河, 等. 生物肥料“宁盾”对大豆疫霉病的防效及对毛豆的促生作用[J]. *上海农业学报*, 2014, 30(6): 95-98
- [33] Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 442-453
- [34] Tian D, Ma X, Li YE, et al. Research on soil bacteria under the impact of sealed CO₂ leakage by high-throughput sequencing technology[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(10): 4096-4104 (in Chinese)
田地, 马欣, 李玉娥, 等. 利用高通量测序对封存 CO₂ 泄漏情景下土壤细菌的研究[J]. *环境科学*, 2013, 34(10): 4096-4104
- [35] Liu J. Effects of soil microbial communities from cucumber rotation and continuous monocropping systems on cucumber seeding growth[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)
刘杰. 连作及轮作土壤微生物菌群对黄瓜生长的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015
- [36] Li FH, Li M, Liu JQ, et al. Effect of biochar on fungal abundance of rhizosphere soil and cucumber root growth in greenhouse[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(4): 265-270, 341 (in Chinese)
李发虎, 李明, 刘金泉, 等. 生物炭对温室黄瓜根际土壤真菌丰度和根系生长的影响[J]. *农业机械学报*, 2017, 48(4): 265-270, 341
- [37] Di Pietro A, Gut-Rella M, Pachiato JP, et al. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(2): 131-135
- [38] Zhao ZT. Phylogenetic and comparative genomic analysis of fungal gene families related to fungal development and

- pathogenicity[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest Agriculture and Forestry University, 2014 (in Chinese)
赵中涛. 真菌生长发育和致病相关基因家族的比较和进化基因组学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2014
- [39] Xing WF, Yu ZY, Chen LJ, et al. Control effect of biological fertilizer "Ningdun" on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(3): 78-81 (in Chinese)
邢卫峰, 于侦云, 陈刘军, 等. 生物肥料“宁盾”对甜瓜枯萎病的防治效果[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 78-81
- [40] Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364
- [41] Xu YC, Shen QR, Ran W. Effect of zero-tillage and application of manure on soil microbial biomass C, N and P after sixteen years of cropping[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(1): 89-96 (in Chinese)
徐阳春, 沈其荣, 冉炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响[J]. *土壤学报*, 2002, 39(1): 89-96
- [42] Ning CC, Wang JW, Cai KZ. The effects of organic fertilizers on soil fertility and soil environmental quality: A review[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(1): 175-181 (in Chinese)
宁川川, 王建武, 蔡昆争. 有机肥对土壤肥力和土壤环境质量的影影响研究进展[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(1): 175-181
- [43] Shan D, He JL, Xing ED, et al. Effects of microbial fertilizer on microorganism and soil enzyme activity in coal mine dump of typical steppe[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2017, 37(3): 81-85 (in Chinese)
珊丹, 何京丽, 邢恩德, 等. 微生物菌肥对草原矿区排土场土壤微生物与土壤酶活性的影响[J]. *水土保持通报*, 2017, 37(3): 81-85
- [44] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of Prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [45] Zhou NY. The relationship between soil bacterial community and application of chemical fertilizers and straw returning[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(10): 2048 (in Chinese)
周宁一. 土壤细菌群落与施用化肥及秸秆还田的关系[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(10): 2048
- [46] Zhou SS, Xu J, Zhu H, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22474