

# 纺锤形芽孢杆菌L13对蓝莓生长及根际土壤生物学特性的影响\*

王君<sup>1,2</sup> 杜秉海<sup>1\*\*</sup> 马海林<sup>2</sup> 刘方春<sup>2</sup> 丁延芹<sup>1</sup> 姚良同<sup>1</sup> 李丽<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山东农业大学生命科学学院, 山东省农业微生物重点实验室 泰安 271018

<sup>2</sup>山东省林业科学研究院 济南 250014

**摘要** 以八年生蓝莓品种“蓝丰”为供试植株, 通过田间试验研究添加纺锤形芽孢杆菌L13在单一菌剂和复合微生物肥料中对植株生长及根际土壤的影响。试验设4个处理, 其中单一菌剂即L13 (P), 以不施肥处理作为对照 (CK); 以灭菌后的腐熟鸡粪作为吸附载体接种酵母菌DY3和乳酸菌DY4作为普通生物肥 (OF), 在此基础上进一步接种L13作为复合微生物肥料 (PF), 以OF作为对照, 分别研究单一菌剂和复合微生物肥料对蓝莓叶片酶活、果实品质、植株养分、根际土壤酶活和理化性质以及细菌群落结构的影响。结果表明: 含L13的两种肥料都显著降低了果实中可滴定酸含量, 提高了植株全氮、全钾含量以及土壤碱解氮、全氮、有机质含量, 促进了蓝莓生长; L13在单一菌剂中的作用更为明显, 和对照相比, 叶片中丙二醛含量降低61.9%, 果实中花青苷含量提高21.68%, 可滴定酸含量降低13.61%, 植株全氮、全磷、全钾分别提高4.12%、10.27%、8.63%, 土壤蔗糖酶、酸性磷酸酶活性分别提高107.59%、21.36%, 土壤碱解氮、有效磷、速效钾、全氮、有机质含量分别提高了49.66%、31.28%、21.95%、63.83%、84.54%, 土壤pH降低, 并且两个处理间各指标都达到了显著性差异。运用Illumina Miseq高通量测序分析根际土壤细菌群落结构发现, L13作为单一菌剂显著降低了土壤细菌菌群丰度和多样性, 而在复合微生物肥料中菌群丰度和多样性增加; 单一菌剂和复合微生物肥料都增加了变形菌门和厚壁菌门的比例, 单一菌剂还增加了放线菌门的比例, 复合微生物肥料增加了拟杆菌门的比例; 放线菌目、芽孢杆菌目等的比例也有所增加; L13在单一菌剂中对蓝莓根际细菌群落结构的影响最为明显, 厚壁菌门的改变是造成结构差异的主要因素。综上, 纺锤形芽孢杆菌L13在两种微生物肥料中都能发挥其促生作用, 在单一菌剂中作用更显著, 土壤细菌群落结构的改变同蓝莓生长、土壤肥力状况存在一定的相关性, 这为PGPR与植物根际的相互作用研究以及微生物肥料的研制提供了理论基础。(图5 表7 参36)

**关键词** 纺锤形芽孢杆菌; 单一菌剂; 复合微生物肥料; 蓝莓; 土壤; 细菌群落结构

CLC Q939.96 : S144

## Effect of *Bacillus fusiformis* L13 on blueberry growth and rhizosphere soil biological characteristics\*

WANG Jun<sup>1,2</sup>, DU Binghai<sup>1\*\*</sup>, MA Hailin<sup>2</sup>, LIU Fangchun<sup>2</sup>, DING Yanqin<sup>1</sup>, YAO Liangtong<sup>1</sup> & LI Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

<sup>2</sup>Shandong Academy of Forest, Jinan 250014, China

**Abstract** The aim of this research was to determine the effect of *Bacillus fusiformis* L13 on blueberry growth and rhizosphere soil when used as single species inoculant and compound microbial fertilizer. A field experiment was conducted using the blueberry breed Bluecrop. We set four treatments in this research, including no fertilizer as a control (CK) for the fermentation liquid of L13 as single species inoculant (P), the normal biological fertilizer of mixture of yeast DY3, lactobacillus DY4 and decomposed chicken manure (OF) as a control for the compound microbial fertilizer (PF) of mixture of OF and L13. Then we measured the enzyme activity in leaves, fruit quality, nutrient content in plant, enzyme activity and physicochemical property of the rhizosphere soil, and the bacterial community of soil. The *B. fusiformis* L13 in the single species inoculant and the compound microbial fertilizer significantly decreased the titratable acid content, increased the content of total nitrogen and total potassium, and increased the available nitrogen, the total nitrogen, and the organic matter in the soil. We found L13

收稿日期 Received: 2015-12-05 接受日期 Accepted: 2016-01-30

\*国家林业公益性行业科研专项 (201204402) 和农业科技成果转化资金项目以及山东省科技重大专项 (2015ZDXX0502B02) 资助 Supported by the Special Project of National Scientific Research of Forestry Public Welfare (201204402), the Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Project "Pilot and Demonstration on Key Technologies of New Biofertilizer for Economic Forest" and the Major Science and Technology Special Project of Shandong Province (2015ZDXX0502B02)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: du\_binghai@163.com)

promoted the growth of blueberry in both microbial fertilizers, being more effective in single application than in the compound one. Compared with CK, the P treatment had 61.9% lower leave MDA content, 21.68% higher fruit anthocyanin, 13.61% lower fruit titratable acid, and 4.12%, 10.27%, 8.63%, respectively, higher contents of total nitrogen, phosphorus, and potassium. The activity of soil invertase was 107.59% higher and the activity of soil acid phosphatase 21.36% higher. In addition, the total nitrogen, the organic matter, and the available nitrogen, phosphorus, and potassium was 63.83%, 84.54%, 49.66%, 31.28%, 21.95%, respectively, higher in P treatment. The pH of the soil was significantly lower with L13 than the CK. We used a next-generation sequencing method, Illumina Miseq detecting the bacterial community of rhizosphere soil. And the results showed that the single species inoculant reduced the bacterial community richness and diversity compared with CK, which increased by using compound fertilizer compared with OF. L13 in both microbial fertilizers increased the proportion of Proteobacteria and Firmicutes, in addition to increasing the percentage of Actinobacteria in single inoculation increasing the percentage of Bacteroidetes in compound application. It also increased the amount of beneficial bacteria including Actinomycetales and Bacillales. The effect of L13 was more obvious when used as single microbial fertilizer, with the change of Firmicutes as a very important factor. The results indicated that *B. fusiformis* L13 used as single species inoculant or compound microbial fertilizer can promote the growth of blueberry, being more effective in single fertilizer. There is some correlation between the change of the bacterial community of rhizosphere soil and the growth of blueberry, as well as soil fertility.

**Keywords** *Bacillus fusiformis*; single species inoculant; compound microbial fertilizer; blueberry; soil; bacterial community

蓝莓 (Blueberry) 又名越桔, 属于杜鹃花科越桔亚科越桔属植物, 原产北美<sup>[1]</sup>, 广泛分布于北半球<sup>[2]</sup>. 蓝莓果实中含有丰富的花青素等物质<sup>[3]</sup>, 具有提高视力、抗衰老、防癌等功效, 被联合国粮农组织列为人类五大健康食品之一<sup>[4]</sup>. 随着人们对这种功能性保健浆果需求量的增加, 我国蓝莓种植面积也急剧扩大, 然而蓝莓品种对土壤条件的特殊要求成为蓝莓人工栽培的一大难题. 蓝莓种植园宜选土壤疏松、通气良好、湿润、有机质含量高的酸性沙壤土、沙土以及有充足水源的地方. 针对蓝莓土壤营养调控, 目前主要的方法是用草炭作为改良基质, 并施加适量酸性肥料<sup>[5]</sup>, 但是草炭造价高, 且属于不可再生资源, 并且蓝莓根系不发达, 对营养吸收能力差. 植物根际促生菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 通过与根系的相互作用以及彼此之间的相互作用影响植株生长和产量<sup>[6]</sup>, 它们可以产生植物激素或促进植物吸收环境中的某些营养物质, 从而促进植物生长<sup>[7-8]</sup>. 由PGPR制成不同类型的微生物肥料在一定程度上促进了植物生长, 增加了植株果实产量和质量, 改善了土壤理化性质<sup>[9]</sup>, 在蓝莓上具有良好的应用前景.

微生物肥料已在粮食、蔬菜、果树等多种植物上取得了良好的应用效果<sup>[10]</sup>, 微生物肥料发展的总趋势是由单一菌剂向复合生物肥发展, 尤其是菌种同有机、无机肥料的复合<sup>[11]</sup>, 但菌株之间、菌株同复合的有机、无机物料之间存在复杂的相互作用, 可能会使菌株在复合肥料中作为单一菌剂时发挥不同的作用, 目前有关这方面的研究较少.

根际微生物同环境和植物根际相互作用, 影响土壤理化性质和植物生长, 因此研究植物根际细菌群落结构能够反映土壤肥力高低, 从而揭示施加微生物肥料对植物根际微环境的影响. 土壤中只有0.1%-1%的微生物是可培养的, 因此传统的微生物培养技术只能反映极少量的土壤微生物组成<sup>[12]</sup>; 一些非培养的研究土壤微生物的技术, 如DNA指纹图谱技术、磷脂脂肪酸分析法, 虽然能够获得一部分不能培养的土壤微生物信息, 但同近年来发展起来的第二代测序方法 (NGS) 相比, 具有通量小和信息量少的缺点<sup>[13-14]</sup>. 第二代

高通量测序方法以Illumina公司的Solexa、Roche公司的454和Life Technologies公司的SOLiD、Ion Torrent为主, 这些测序技术最大特点就是数据产出通量高, 在土壤微生物群落结构研究中具有重要的作用<sup>[15]</sup>.

我们以从蓝莓根际筛选到的纺锤形芽孢杆菌 (*Bacillus fusiformis*) L13为供试菌株, 并将其与通用生物型菌株 (乳酸菌和酵母菌) 按照一定比例复合到灭菌后的腐熟鸡粪中, 制成蓝莓复合微生物肥料, 分别研究含L13的单一菌剂和复合微生物肥料对蓝莓生长以及土壤养分、酶活的影响, 同时运用Illumina Miseq高通量测序技术, 探讨两种肥料对蓝莓根际土壤细菌群落结构的影响, 为蓝莓微生物肥料的研制提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验点概况

试验于2014年3月24日蓝莓萌芽前在青岛佳沃蓝莓种植基地 (胶南臧家庄村, 35.78 °N, 119.79 °E) 进行. 该地区属温带海洋性季风气候, 年平均气温12.1 °C, 年降雨量适中, 夏季凉爽而潮湿, 冬季寒冷而湿润, 四季分明, 无霜期202 d, 年日照2 447.1 h. 供试植株为种植在冷棚中的8年生“蓝丰” (*Vaccinium corymbosum* L., ‘Bluecrop’), 树高为1.3-1.6 m, 每株有4-8个主枝, 株行距为1 m × 1.5 m, 高垄栽培. 土壤pH值为4.32, 有机质含量为11.12 g/kg, 土壤碱解氮、有效磷和速效钾的含量分别为75.25 mg/kg、30.78 mg/kg和 96.92 mg/kg.

### 1.2 试验材料及方案

供试菌株为从蓝莓根际筛选到的纺锤形芽孢杆菌L13, 保藏于山东农业大学微生物实验室. 所用L13发酵液浓度为  $2.5 \times 10^8$  cfu/ml, 供试肥料为L13菌剂、普通生物肥、L13复合微生物肥料, 其中普通生物肥为结合通用的酵母菌DY3和乳酸菌DY4, 按照DY4 : DY3 : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2的比例接种到灭菌后的腐熟鸡粪 (微生物肥料的吸附载体) 中 (活菌数  $0.5 \times 10^8$  cfu/g); L13复合微生物肥料为按照DY4 : DY3 : L13 = 1 : 1 : 2的比例接种到灭菌后的腐熟鸡粪中 (活菌数  $0.5 \times 10^8$  cfu/g).

试验设4个处理: 1) 施用L13菌剂(简称P), 每株1 L, 将1 L菌剂与1 L水混匀, 浇灌施入距树干30 cm以内的土壤中, 接种后覆土; 2) 不施用任何肥料(简称CK); 3) 施用L13复合微生物肥料(简称PF), 每株10 kg, 沟施; 4) 施用普通生物肥(简称OF), 每株10 kg, 沟施。各处理随机区组设计, 每处理12株树, 3次重复。于2014年3月24日蓝莓萌芽前施肥, 正常管理。

### 1.3 样品采集

2014年9月10日, 分别采集各处理的叶片、果实及植株样品, 用液氮速冻并保存于-80 °C冰箱, 用于测定叶片酶活、果实品质、植株养分相关指标; 各处理随机选取3个样点, 去除表层10 cm左右表层土, 采用剥落分离法<sup>[16]</sup>采集蓝莓根际土壤, 每个样品混匀后分为两份, 装入密封袋中, 其中一份风干过筛后测定土壤酶活及养分, 另一份用于土壤总DNA提取。

### 1.4 测定方法

**1.4.1 叶片抗氧化酶活性测定** 叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量测定方法参考文献[17]进行。

**1.4.2 果实品质测定** 花青苷含量采用高效液相色谱法测定; 还原性维生素C含量采用2, 6-二氯酚法测定<sup>[18]</sup>; 可溶性糖含量采用苯酚法测定<sup>[19]</sup>; 可溶性固形物含量采用手持式糖度计测定; 可滴定酸含量采用NaOH滴定法测定; 糖酸比=可溶性固形物含量/可滴定酸含量。

**1.4.3 植株养分测定** 植株样品采用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消煮法<sup>[20]</sup>消煮, 消煮液采用凯氏定氮法、钼钒黄比色法、火焰光度法分别测定植株全氮、全磷、全钾含量。

**1.4.4 根际土壤酶活及理化性质测定** 土壤脲酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、酸性磷酸酶活性分别采用苯酚钠比色法、高锰酸钾滴定法、3, 5-二硝基水杨酸比色法、磷酸苯二钠比色法进行测定<sup>[21]</sup>。

土壤pH用pH计测定; 碱解氮、有效磷、速效钾的测定分别采用碱解扩散法、0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub>浸提-钼锑抗比色法、

1 mol/L NH<sub>4</sub>Ac浸提-火焰光度法; 土壤有机质含量采用重铬酸钾硫酸氧化比色法; 全氮含量用凯氏定氮法测定<sup>[18]</sup>。

**1.4.5 根际土壤细菌群落结构分析** 土壤总DNA的提取采用美国OMEGA公司生产的E.Z.N.A. Soil DNA Kit, 对所提取的DNA浓度检测合格后, 密封寄送至上海翰宇生物科技有限公司, 通过Illumina MiSeq测序平台进行16S rDNA细菌群落结构分析。

图1为数据分析流程, 选择恰当的引物, 对样品16S rDNA的V3、V4高可变区进行扩增, 将PCR扩增产物纯化、定量和均一化后, 上机进行高通量测序。测序时, 各序列引入了一段标志其样品来源的barcode标签, 下机后统计原始数据, 原始数据中含有完整barcode标签的序列为有效序列, 然后将有效序列进行去杂, 用最终得到的优化序列进行后续的生物信息学分析。

通常一条序列来自一个菌, 根据所得优化序列的相似性, 将序列分归为许多小组, 一个小组称为一个操作分类单元(OTU, Operational Taxonomic Units), 最常用的OTU相似性水平为97%。分类时, 对测序序列随机取样, 以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建稀释曲线(Rarefaction curve), 当稀释曲线趋于平坦时, 说明更多的取样产生新的OTU的数目较少, 说明测序数据量合理, 另外, 稀释曲线还能初步反应各样本的菌群丰度。深度测序指数覆盖率(Coverage)反应测序结果是否能代表样本的真实情况。在此依据的基础上, 统计各样本的OTU分布, 进一步进行Alpha分析、Taxonomy分析、Beta分析。

Alpha分析包括菌群丰度、菌群多样性以及Rank Abundance曲线, 其中菌群丰度由chao指数和Ace指数反应, 菌群多样性由Simpson指数和Shannon指数反应, Rank Abundance曲线反应了样品所含物种的丰富程度和均匀程度。Taxonomy分析, 即分类学分析是在OTU产生后, 统计各个样品含有的OTU及每个OTU中含有的序列数目, 然后将OTU代表序列与Greengene数据库比对, 得到每个OTU的种属信

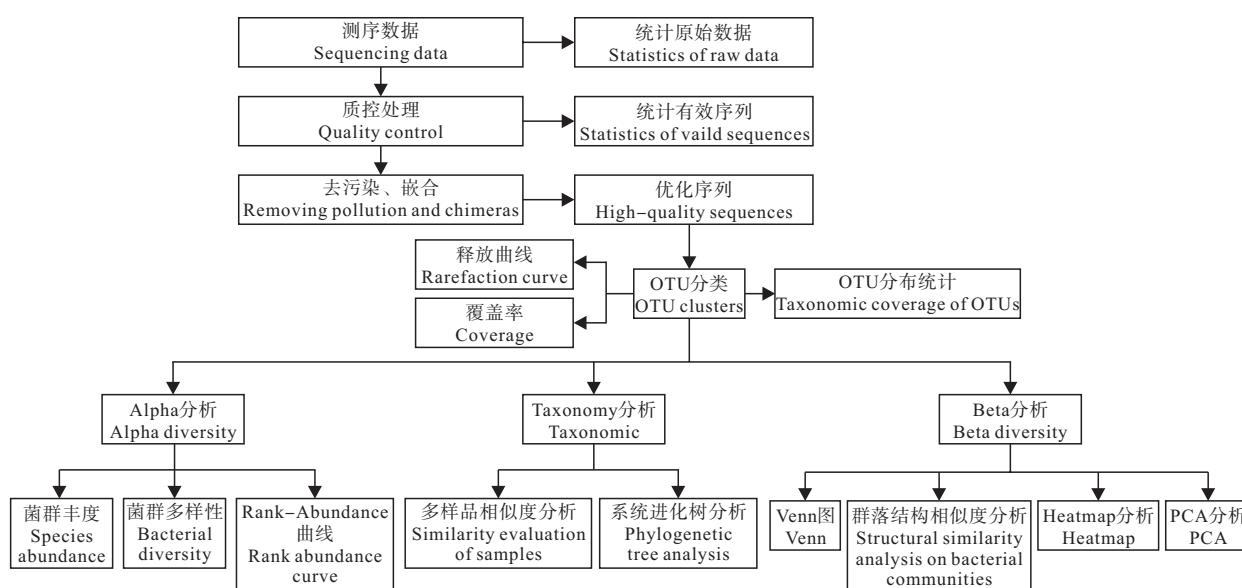


图1 细菌群落结构分析流程。

Fig. 1 Flowchart of bacterial community structure analysis.

息,进行多样品相似度分析和系统进化树分析.多样品相似度分析是将各样品的所有OTU在某一分类水平上(门、纲、目、科、属、种)进行归类,绘制成柱状图或饼状图,反映样品在某一分类水平上的物种组成比例情况;系统进化树则反映了样品中包含的不同物种之间的相似度及进化关系. Beta分析包括韦恩图(Venn图)、群落结构相似度分析、热图分析(Heatmap分析)以及主成分分析(PCA, Principal component analysis). 韦恩图以直观的形式反映出各样品之间共有的OTU数目和不同的OTU数目;热图通过颜色梯度反映出在某一分类水平上各样品的群落结构的相似性和差异性;群落结构相似度分析可以从整个分类系统上全面了解样品中所有微生物的进化关系和丰度差异,距离越近说明群落结构越相似;主成分分析可以用来反映不同样品中微生物群落组成的相似性以及影响微生物多样性的主要因素. 所有分析中涉及到的OTU都建立在97%相似性水平上.

1.5 数据统计与分析

蓝莓叶片酶活、果实品质、植株养分、土壤酶活及养分数据通过Excel 2007、SPSS 19.0进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 叶片抗氧化酶活性分析

表1为4个处理对蓝莓叶片抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响,可以看出,各处理蓝莓叶片过氧化物酶活性差异不显著;超氧化物酶活性处理P同CK相比显著降低,降低了13.13%,处理PF同OF相比降低了8.26%,但未达到显著性差异;过氧化氢酶活性处理PF同OF相比显著增加了172%,但处理P和CK无显著性差异;处理P和CK相比、PF和OF相比丙二醛含量都达到了显著性差异,P比CK减少了61.9%,PF比OF增加了45.65%. 可见,L13单一菌剂处理P显著降低了蓝莓叶片超氧化物酶活性和丙二醛含量,而L13在复合微生物肥料处理

PF中显著增加了过氧化氢酶活性和丙二醛含量,两种微生物肥料对其它几种叶片酶活都无显著影响.

2.2 果实品质分析

表2为蓝莓果实品质相关指标的测定结果. 处理P和CK相比,花青苷含量增加了21.68%,达到了显著性差异,维生素C含量显著降低了22.7%,可滴定酸显著降低了13.61%,可溶性固形物、可溶性糖以及糖酸比无显著性差异;处理PF和OF相比,花青苷含量、可溶性固形物以及溶性糖无显著性差异,可滴定酸显著降低了10.81%,维生素含量和糖酸比显著增加,分别增加了60.69%、20.13%. 由此可见,L13在单一菌剂及复合微生物肥料中都能显著降低蓝莓果实中可滴定酸含量,在单一菌剂中还显著提高了花青苷含量,在复合微生物肥料中提高了维生素含量和糖酸比.

2.3 植株养分分析

植株全氮(N)、全磷(P)、全钾(K)含量测定结果如表3所示. 处理P和CK相比,3种植株养分含量都显著增加,全氮、全磷、全钾含量分别比CK增加了4.12%、10.27%、8.63%;处理PF和OF相比,植株全氮和全钾含量分别显著增加了4.20%、6.70%,但全磷含量显著降低了9.53%. L13无论在单一菌剂中,还是在复合微生物肥料中都能在一定程度上提高蓝莓植株养分含量.

2.4 根际土壤酶活及理化性质分析

对蓝莓根际土壤酶活测定结果(表4)显示,处理P蔗糖酶活性达到了8.20 mg/g,酸性磷酸酶活性达到了5.91 mg/g,同CK相比两者都达到了显著性差异,分别增加了107.59%、21.36%,但过氧化氢酶和脲酶活性两个处理间未达到显著性差异;处理PF和OF相比仅过氧化氢酶活性达到了显著性差异,增加了9.46%.

由根际土壤理化性质测定结果(表5)可以看出,处理P和CK相比,土壤pH显著降低,达到了4.25,碱解氮、有效磷、速效钾、有机质以及全氮含量都达到了显著性差异,分别比

表1 不同处理对蓝莓叶片抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

Table 1 Effect of different treatments on activity of antioxidant enzymes and malondialdehyde (MDA) content of blueberry leaves

| 处理<br>Treatment | 超氧化物歧化酶<br>Superoxide dismutase (SOD)<br>( $\lambda/U\ g^{-1}\ FW$ ) | 过氧化物酶<br>Peroxidase (POD)<br>( $\lambda/U\ g^{-1}\ min^{-1}\ FW$ ) | 过氧化氢酶<br>Catalase (CAT)<br>( $\lambda/U\ g^{-1}\ min^{-1}\ FW$ ) | 丙二醛<br>Malondialdehyde (MDA)<br>( $b/\mu mol\ g^{-1}\ FW$ ) |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| P               | 228.19 $\pm$ 2.68 b                                                  | 16.67 $\pm$ 3.33 a                                                 | 20.00 $\pm$ 5.00 b                                               | 0.024 $\pm$ 0.006 c                                         |
| CK              | 262.69 $\pm$ 5.97 a                                                  | 6.67 $\pm$ 0.65 a                                                  | 33.75 $\pm$ 1.25 b                                               | 0.063 $\pm$ 0.004 a                                         |
| PF              | 163.64 $\pm$ 4.96 c                                                  | 10.00 $\pm$ 3.33 a                                                 | 85.00 $\pm$ 10.00 a                                              | 0.067 $\pm$ 0.002 a                                         |
| OF              | 178.38 $\pm$ 5.41 c                                                  | 20.00 $\pm$ 6.67 a                                                 | 31.25 $\pm$ 3.75 b                                               | 0.046 $\pm$ 0.004 b                                         |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥. 不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

表2 不同处理对蓝莓果实品质的影响

Table 2 Effect of different treatments on fruit quality of blueberry

| 处理<br>Treatment | 花青苷<br>Anthocyanin ( $\lambda/U\ g^{-1}\ FW$ ) | 维生素C<br>Vitamin C ( $w/mg\ kg^{-1}$ ) | 可溶性固溶物<br>Soluble solids ( $w/\%$ ) | 可溶性糖<br>Soluble sugar ( $w/mg\ g^{-1}\ FW$ ) | 可滴定酸<br>Titratable acid ( $w/\%$ ) | 糖/酸<br>Sugar/acid  |
|-----------------|------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| P               | 185.80 $\pm$ 3.46 a                            | 1061.48 $\pm$ 15.38 b                 | 9.84 $\pm$ 2.38 a                   | 46.15 $\pm$ 1.52 a                           | 7.62 $\pm$ 0.27 b                  | 1.29 $\pm$ 0.12 bc |
| CK              | 152.70 $\pm$ 3.78 b                            | 1373.27 $\pm$ 22.41 a                 | 10.08 $\pm$ 2.14 a                  | 45.75 $\pm$ 1.45 a                           | 8.82 $\pm$ 0.19 a                  | 1.14 $\pm$ 0.17 c  |
| PF              | 174.60 $\pm$ 3.69 a                            | 1393.78 $\pm$ 12.55 a                 | 11.84 $\pm$ 2.11 a                  | 45.80 $\pm$ 1.61 a                           | 6.60 $\pm$ 0.37 c                  | 1.79 $\pm$ 0.21 a  |
| OF              | 177.80 $\pm$ 2.87 a                            | 867.36 $\pm$ 23.78 c                  | 11.04 $\pm$ 2.09 a                  | 46.38 $\pm$ 1.74 a                           | 7.40 $\pm$ 0.22 b                  | 1.49 $\pm$ 0.11 b  |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥. 不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

表3 不同处理对蓝莓植株养分含量的影响

Table 3 Effect of different treatments on nutrient content in plant of blueberry

| 处理<br>Treatment | 全氮<br>Total nitrogen<br>(w/%) | 全磷<br>Total phosphorus<br>(w/%) | 全钾<br>Total potassium<br>(w/%) |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| P               | 3.542 ± 0.076 bc              | 0.408 ± 0.0098 b                | 0.667 ± 0.013 b                |
| CK              | 3.402 ± 0.035 a               | 0.37 ± 0.0085 a                 | 0.614 ± 0.0061 a               |
| PF              | 3.599 ± 0.041 c               | 0.408 ± 0.0085 b                | 0.653 ± 0.0078 b               |
| OF              | 3.454 ± 0.11 ab               | 0.451 ± 0.0072 c                | 0.612 ± 0.012 a                |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

表4 不同肥料处理对蓝莓根际土壤酶活性的影响

Table 4 Effect of different treatments on enzyme activity of blueberry rhizosphere soil

| 处理<br>Treatment | 过氧化氢酶<br>Catalase<br>( $\lambda/\text{mL g}^{-1}$ ) | 脲酶<br>Urease<br>( $\lambda/\text{mg g}^{-1}$ ) | 蔗糖酶<br>Invertase<br>( $\lambda/\text{mg g}^{-1}$ ) | 酸性磷酸酶<br>Acid phosphatase<br>( $\lambda/\text{mg g}^{-1}$ ) |
|-----------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| P               | 8.81 ± 0.28 a                                       | 0.19 ± 0.018 a                                 | 8.20 ± 0.18 a                                      | 5.91 ± 0.07 b                                               |
| CK              | 8.25 ± 0.05 ab                                      | 0.18 ± 0.005 a                                 | 3.95 ± 0.00 b                                      | 4.87 ± 0.19 c                                               |
| PF              | 8.68 ± 0.12 a                                       | 0.22 ± 0.002 a                                 | 9.72 ± 0.72 a                                      | 6.77 ± 0.19 a                                               |
| OF              | 7.93 ± 0.16 b                                       | 0.20 ± 0.023 a                                 | 8.73 ± 0.63 a                                      | 6.49 ± 0.27 ab                                              |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

CK增加了49.66%、31.28%、21.95%、84.54%、63.83%，提高了土壤养分含量；处理PF同CK相比，土壤pH降低，但未达到显著性差异，养分含量指标中，碱解氮、有机质和全氮含量达到了显著性差异，分别比OF增加了19.91%、29.92%、4.07%，有效磷和速效钾含量有所增加，但未达到显著性差异。

表5 不同处理对蓝莓根际土壤理化性质的影响

Table 5 Effect of different treatments on physicochemical properties of blueberry rhizosphere soil

| 处理<br>Treatment | pH            | 碱解氮<br>Available nitrogen<br>(w/mg kg <sup>-1</sup> ) | 有效磷<br>Available phosphorus<br>(w/mg kg <sup>-1</sup> ) | 速效钾<br>Available potassium<br>(w/mg kg <sup>-1</sup> ) | 有机质<br>Organic matter<br>(w/g kg <sup>-1</sup> ) | 全氮<br>Total nitrogen<br>(w/g kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|---------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| P               | 4.25 ± 0.04 b | 82.39 ± 3.00 b                                        | 36.09 ± 1.54 b                                          | 125.01 ± 2.89 a                                        | 18.86 ± 0.15 c                                   | 2.31 ± 0.06 c                                   |
| CK              | 4.98 ± 0.11 a | 55.05 ± 0.37 c                                        | 27.49 ± 2.74 c                                          | 102.51 ± 5.77 b                                        | 10.22 ± 1.60 d                                   | 1.41 ± 0.12 d                                   |
| PF              | 4.12 ± 0.06 b | 101.49 ± 3.37 a                                       | 43.93 ± 1.29 a                                          | 128.33 ± 2.57 a                                        | 32.39 ± 2.62 a                                   | 2.57 ± 0.05 a                                   |
| OF              | 4.19 ± 0.08 b | 84.64 ± 3.75 b                                        | 40.19 ± 2.45 a                                          | 125.01 ± 3.89 a                                        | 24.93 ± 1.12 b                                   | 2.46 ± 0.06 b                                   |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

表6 16S rDNA 分析结果

Table 6 Analytic results of 16S rDNA

| 处理<br>Treatment | OTU  | ACE         | Chao        | Shannon  | Simpson  | Coverage |
|-----------------|------|-------------|-------------|----------|----------|----------|
| P               | 1403 | 3262.362522 | 2548.508197 | 5.741892 | 0.009864 | 0.952541 |
| CK              | 1872 | 4411.247769 | 3276.32069  | 6.339076 | 0.004459 | 0.925068 |
| PF              | 1175 | 2699.945061 | 2028.452381 | 5.20759  | 0.016584 | 0.966611 |
| OF              | 931  | 1915.688248 | 1496.510791 | 5.150586 | 0.021627 | 0.961753 |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。OTU: 操作分类单元; ACE、Chao: 菌群丰度指数; Shannon、Simpson: 菌群多样性指数; Coverage: 深度测序指数

P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer. OTU: operational taxonomic units; ACE and Chao: indices of bacterial abundance; Shannon and Simpson: indices of bacterial diversity; Coverage: index of deep sequencing.

## 2.5 根际土壤细菌群落结构分析

2.5.1 OTU分类及Alpha分析 由表6的16S rDNA分析结果看出，4个样本深度测序指数覆盖率 (Coverage) 都在0.9以上，说明样品中序列没被测出的概率较小，本次测序结果能够代表样本的真实情况。OTU分布统计结果显示，样本P所包含的OTU数目比CK少469，而样本PF包含的OTU数目比OF增加了244。表2中ACE和Chao为评估样品菌群丰度的两个指数，它们的算法不同，但反映的结果具有一致性，样品菌群丰度由大到小依次为CK、P、PF、OF。Shannon和Simpson是评估菌群多样性的两个指数，两者算法也不同，Simpson指数值越大，说明群落多样性越低，而Shannon值越大，说明群落多样性越高。由表2中两个指数的数值可以得出，4个样品菌群多样性大小依次为CK > P > PF > OF。

2.5.2 Taxonomy分析 4个样品所有序列共归为3 238个OTU，将每个OTU的代表序列与GenBank数据库比对后得知，仅样品P中一条序列属于古生菌界，其它序列都属于细菌界。这些序列在细菌界中分属于33个门，如图2为4个样品在门水平上的细菌群落结构组成。由图可知试验所用蓝莓根际土壤细菌主要分布在3个门：变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria)，3个门所占百分比之和在每个样品中都达到80%以上。样本P同CK相比，变形菌门、放线菌门、厚壁菌门 (Firmicutes)、待定门 (OD1) 和暂定类群 (TM7) 所占的比例增加，其中，放线菌门和厚壁菌门增加比例明显，分别比CK增加了4.66%、5.44%；样品PF同OF相比，变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、暂定类群TM7所占比例增加，其中变形菌门增加了3.08%。

2.5.3 Beta分析 图3韦恩图显示了4个样品共有以及特有的OTU数目。样品P和CK共包含2 677个OTU，其中共有的OTU数目为598个，P特有的为805个，CK特有的为1 274个；样品PF和OF共包含1 553个OTU，其中共有的OTU数目为553个，

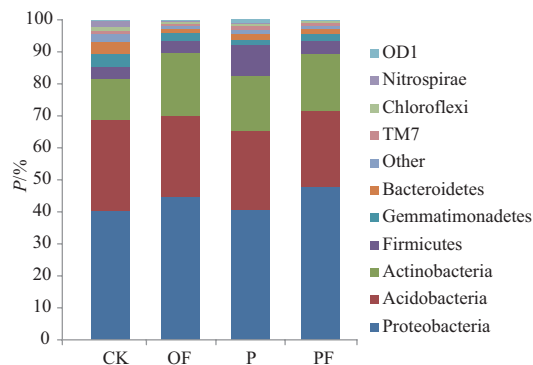


图2 门水平上的细菌群落结构组成. P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥.  
Fig. 2 Comparison of the bacterial communities at the phylum level. P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer.

PF特有的为622个, OF特有的为378个. 表7为各样品特有的OTU在门水平上的分布, P和CK相比, P特有的OTU主要分布在变形菌门(34.04%)、厚壁菌门(18.39%)、放线菌门(14.16%), CK特有的OTU主要分布在变形菌门(42.23%)、酸杆菌门(10.68%)、拟杆菌门(9.58%), PF和OF相比, PF特有的OTU主要分布在变形菌门(38.75%)、厚壁菌门(11.85%)、放线菌门(11.25%), OF特有的OTU主要分布在变形菌门(37.57%)、放线菌门(15.34%)、厚壁菌门(13.76%).

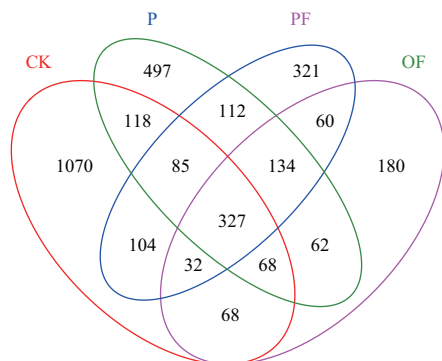


图3 不同施肥处理的韦恩图. P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥.  
Fig. 3 Venn diagram of different fertilizer treatments. P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer.

表7 门水平上各样品特有的OTU分布  
Table 7 Distribution of unique OTUs at the phylum level

| P和CK比较 P vs CK |                               |                  |                               | PF和OF比较 PF vs OF |                               |                  |                               |
|----------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
| P              | 特有OTU<br>Unique OTUs<br>(r/%) | CK               | 特有OTU<br>Unique OTUs<br>(r/%) | PF               | 特有OTU<br>Unique OTUs<br>(r/%) | OF               | 特有OTU<br>Unique OTUs<br>(r/%) |
| Acidobacteria  | 7.58                          | Acidobacteria    | 10.68                         | Acidobacteria    | 7.56                          | Acidobacteria    | 7.14                          |
| Actinobacteria | 14.16                         | Actinobacteria   | 8.63                          | Actinobacteria   | 11.25                         | Actinobacteria   | 15.34                         |
| Bacteroidetes  | 4.47                          | Bacteroidetes    | 9.58                          | Bacteroidetes    | 6.43                          | Bacteroidetes    | 3.17                          |
| Chloroflexi    | 3.11                          | Chloroflexi      | 3.38                          | Firmicutes       | 11.58                         | Chloroflexi      | 3.70                          |
| Firmicutes     | 18.39                         | Firmicutes       | 5.49                          | Proteobacteria   | 38.75                         | Firmicutes       | 13.76                         |
| Proteobacteria | 34.04                         | Gemmatimonadetes | 3.77                          | TM7              | 5.79                          | Gemmatimonadetes | 4.50                          |
| TM7            | 6.21                          | Proteobacteria   | 42.23                         | Chlamydiae       | 3.54                          | Proteobacteria   | 37.57                         |
| 其它 Other       | 12.05                         | TM7              | 3.38                          | Chloroflexi      | 3.22                          | TM7              | 3.17                          |
|                |                               | 其它 Other         | 12.87                         | 其它 Other         | 11.90                         | 其它 Other         | 11.64                         |

P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥.  
P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer.

热图分析基于属的分类水平将样品中高丰度和低丰度的物种进行聚类, 图中颜色由红色到绿色表示OTU数目由多到少. 由图4可以看出, 样品CK中比例较大的OTU种类显著区别于P, OF和PF也存在较大的差异. OTU数目在P和PF中所占比例都较大而在CK和OF中所占比例较小的为红螺菌科(Rhodospirillaceae)、Sinobacteraceas、放线菌目(Actinomycetales)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)中未分类属; 除此之外, P中OTU在乳球菌属(*Lactococcus*)、芽孢杆菌目(Bacillales)未分类属、产黄杆菌属(*Rhodanobacter*)中所占比例较大, PF中OTU在罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)中所占比例较大. 而样品CK中OTU主要分布在紫色非硫细菌(*Rhodoplanes*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)以及其它一些未分类的属; OF中OTU主要分布在黄单胞菌属(*Xanthomonadaceae*)、短根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)以及Gaiellaceae、醋酸杆菌科(Acetobacteriaceae)、暂定类群TM1中未分类属.

主成分分析是一种对数据进行简化的技术, 它可以有效地找出数据中最主要的影响因素, 并通过方差分解反应在二维坐标图上. 如图5, 能最大反应方差值的两个特征值分别为PC1、PC2, 它们对样品产生差异的贡献率分别为62.91%、33.36%. 样品CK的PC1值低但具有较高的PC2值, 拟杆菌门、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、酸杆菌门、绿弯菌门(Chloroflexi)以及芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)是影响CK细菌群落结构的主要因素; 样品P的PC1值和PC2值都较高, 厚壁菌门、待门OD1以及暂定类群TM7是影响其细菌群落结构的主要因素; 样品PF、OF在PCA中距离最近, 说明两个样本群落结构相似程度较高, 它们具有较高的PC1值、较低的PC2值, 放线菌门和变形菌门是影响两者细菌群落结构的主要因素.

### 3 讨论与结论

目前, 由植物根际促生细菌(PGPR)研制的不同微生物肥料在常规农业中已得到广泛应用, 并取得了良好的增产效果<sup>[22]</sup>. 研究表明, 试验中应用的纺锤形芽孢杆菌L13菌剂(P)以及由普通生物肥和L13形成的复合微生物肥料(PF)可在不同程度上提高蓝莓根际土壤的生物活性和土壤肥力, 复合微

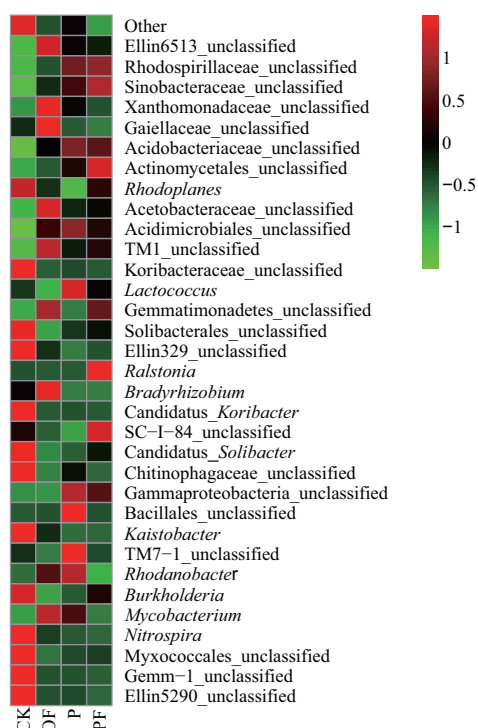


图4 不同施肥处理的热图。P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。

**Fig. 4** Heatmap of different fertilizer treatments. P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer.

生物肥料的作用更为显著<sup>[23]</sup>。本研究以不施肥处理CK作为L13菌剂处理(P)的对照,以普通生物肥处理(OF)作为L13复合微生物肥料处理(PF)的对照,分别研究了纺锤形芽孢杆菌L13在单一菌剂中和复合微生物肥料中发挥的不同作用。

### 3.1 纺锤形芽孢杆菌L13对蓝莓生长的影响

研究发现,单一菌剂和复合微生物肥料都显著降低了蓝莓果实中可滴定酸含量,提高了植株全氮、全钾含量,在一定程度上提高了植株养分含量以及蓝莓果实的品质。但L13在两种肥料中发挥的作用也有不同之处,它在单一菌剂中显著降低了叶片中丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性,而在复合微生物肥料中显著提高了叶片中丙二醛含量和过氧化氢酶活性。丙二醛含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的高低是评价植物抵御不良环境能力的重要指标。植物在逆境或衰老条件下会发生脂膜的过氧化作用,丙二醛含量升高<sup>[24]</sup>;逆境胁迫还会降低植物细胞保护酶的活性,但当逆境程度超过植物的耐受能力时,植物启动自身的保护机制,酶活性升高<sup>[25]</sup>。由此推测,单一菌剂能提高植物的抗逆性,在同样的逆境条件下植物积累的丙二醛含量少于未施肥处理,同时叶片超氧化物歧化酶活性未升高也说明植物具有更强的耐受力;而在复合微生物肥料中L13没有发挥提高植物抗逆性的作用,但过氧化氢酶活性升高,在一定程度上降低了植物的受伤害程度。L13单一菌剂提高了果实中花青苷含量,在复合微生物肥料中提高了果实中维生素C含量和糖酸比,两者在不同方面提高了蓝莓果实的营养价值。另外, L13在单一菌剂中和在复合肥料中发挥的作用相比还提高了植株全磷含量。可见, L13在单一菌剂中对植物生长产生的影响比在复合肥料中更大。

### 3.2 纺锤形芽孢杆菌L13对蓝莓根际土壤酶活和理化性质的影响

土壤酶主要来源于植物根系、动植物残体以及微生物,微生物的生命活动为土壤酶作出了很大的贡献,如蔗糖酶、脲酶、磷酸酶都可能来源于微生物<sup>[26]</sup>。土壤中过氧化氢酶、蔗糖酶以及酸性磷酸酶活性的高低主要取决于土壤有机质

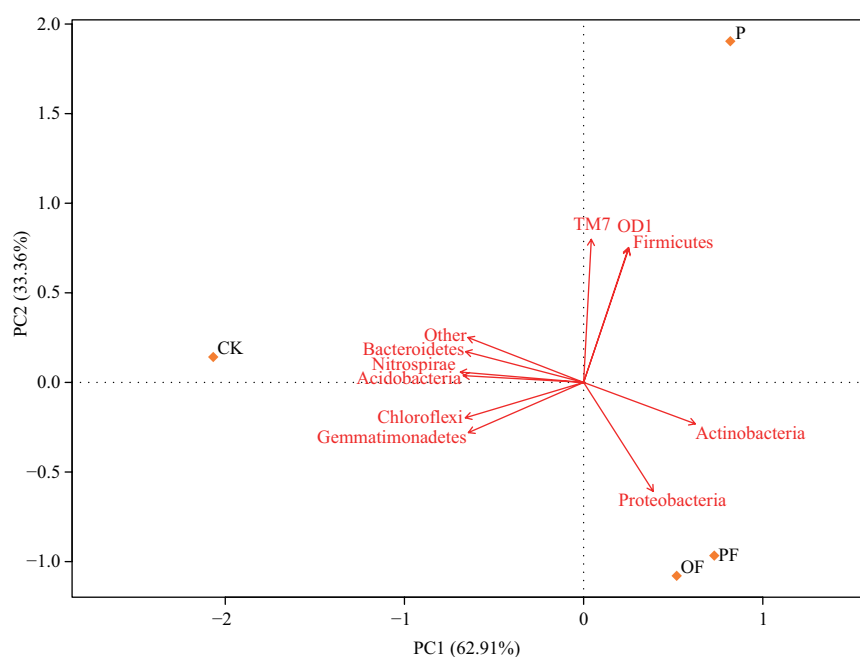


图5 不同施肥处理的主成分分析。P: L13单一菌剂; CK: 未施加肥料; PF: L13复合微生物肥料; OF: 普通生物有机肥。

**Fig. 5** Principal component analysis of different fertilizer treatments. P: single species inoculant of L13; CK: treatment with no fertilizer; PF: compound microbial fertilizer of L13; OF: normal biological fertilizer.

和全氮含量的高低,并同土壤中氮、磷、钾元素的有效性相关<sup>[27]</sup>,土壤酶活在一定程度上反映了土壤肥力状况。L13作为单一菌剂显著提高了土壤蔗糖酶活性和酸性磷酸酶活性,而在复合微生物肥料中提高了过氧化氢酶的活性,两者从不同方面促进了土壤中的代谢活动,有利于土壤肥力的提高。两种肥料都降低了土壤pH,提高了碱解氮、有机质和全氮含量,为蓝莓生长提供了更适宜的土壤pH和养分,另外,单一菌剂在土壤有效磷和速效钾的提高中也发挥了作用。

### 3.3 纺锤形芽孢杆菌L13对蓝莓根际土壤细菌群落结构的影响

细菌约占土壤微生物总数量的70%-90%,它们不仅参与土壤养分循环(有机质和无机质的转化),而且对整个土壤生态系统起着重要的作用<sup>[28]</sup>,运用高通量技术分析L13在不同组成的微生物肥料中对蓝莓根际细菌群落结构的影响,进一步了解了纺锤形芽孢杆菌在蓝莓根际微生态环境的改变中所起的作用。

通过分析发现,单一菌剂(P)及其复合微生物肥料(PF)都能改变蓝莓细菌群落结构,但两者存在差别。单一菌剂显著降低了蓝莓根际土壤细菌菌群丰度和多样性,多数的研究中,PGPR能够增加土壤菌群多样性<sup>[29-31]</sup>,但本次研究中L13菌剂的影响却与之相反,这可能包含多方面的原因,一方面蓝莓土壤不同于其它植物生长环境,属于酸性环境,pH较低,施肥前土壤中的微生物种类以及理化性质等具有特殊性,因此施肥后根际环境产生的变化不同;另一方面,纺锤形芽孢杆菌同土壤中的其它微生物可能存在拮抗作用,它作为优势菌能更好地定殖于蓝莓根际,从而影响了其它细菌的生存。然而,复合微生物肥料增加了菌群丰度和多样性,这可能是因为肥料中含有的腐熟鸡粪中有大量的有机物质,为L13提供营养成分,存在一定的缓冲作用,加之乳酸菌和酵母菌的存在,是植物根系同微生物之间的作用更加复杂,L13发挥的作用也存在差异。

L13还改变了蓝莓根际土壤中各菌群的比例,其中厚壁菌门所占比例增加是群落结构改变的重要原因。L13为纺锤形芽孢杆菌,它定殖于植物根际可能会引起与L13相近的各种芽孢杆菌数量的增加,同时抑制了某些与之有拮抗作用的细菌的生存,从而引起土壤中厚壁菌门比例的增加。另外,厚壁菌门中包含的芽孢杆菌是一类重要的植物根际促生菌,能通过固氮、解磷、产生植物激素等促进植物生长,还能通过抑制病原物和诱导系统抗性来防治植物病害<sup>[32]</sup>,因此,厚壁菌门比例的增加可能更加有利于植株生长。L13单一菌剂中比例增加的黄杆菌属以及复合微生物肥料中增加的放线菌目,都是应用广泛的根际促生菌,包含很多具有促生或生防潜能的菌株<sup>[33-34]</sup>。紫色非硫细菌属、伯克霍尔德氏菌属、硝化螺旋菌属在施加微生物肥料的土壤中数量明显低于未施的土壤,说明L13对这3类菌产生了影响。紫色非硫细菌能够产氢<sup>[35]</sup>,施肥后土壤pH的降低可能与这类菌数量的减少有关,从而为蓝莓生长提供更适宜的土壤环境。

综上所述,纺锤形芽孢杆菌L13在单一菌剂和复合微生物肥料中对蓝莓生长和土壤生物学特性都产生了影响,在单一菌剂中更为显著,对叶片酶活、果实品质、植株养分含量、土壤酶活和化学性质各方面都发挥了作用,土壤根际细菌群

落结构也产生了很大的变化。而L13同普通生物肥复合后所发挥的作用相对于单一菌剂中较弱,但和普通生物肥相比也能改善土壤肥力,提高植株养分含量,促进蓝莓生长,根际土壤细菌群落变化也相对较小。由此可见,根际土壤细菌群落结构的变化和植物生长、土壤养分等指标的变化程度具有一定的相关性。虽然本研究中L13在复合肥料中发挥的作用比在单一菌剂中的作用小,但复合肥料中包含的营养物质以及其它微生物种类综合作用使其更有利于植物的生长,复合微生物肥料在多种植物的应用研究中表明,它比单一菌剂更有利于植物的生长<sup>[9,36]</sup>,因此,如何使L13在复合肥料中最大程度地发挥其促生效果需要进一步研究,才能更好地改善土壤微环境,促进植物生长。

### 参考文献 [References]

- 1 刘克宁,李公存,顾海燕,苏佳明,赵明. 蓝莓核心种质资源评价[J]. 山东农业科学, 2011 (1): 20-23 [Liu KN, Li GC, Gu HY, Su JM, Zhao M. Evaluation of key blueberry germplasm resources [J]. *Shandong Agric Sci*, 2011 (1): 20-23]
- 2 修英涛,常凤英,姜河,杨伟力,侯利军. 我国蓝莓(越桔)研究现状及发展措施[J]. 辽宁农业科学, 2003 (3): 21-23 [Xiu YT, Chang FY, Jiang H, Yang WL, Hou LJ. Research status and development measures of blueberry (vaccinium) in our country [J]. *Liaoning Agric Sci*, 2003 (3): 21-23]
- 3 张铭浩,杨晶,许孝瑞. 新兴果树蓝莓的发展前景与栽培技术[J]. 落叶果树, 2011 (2): 20-22 [Zhang MH, Yang J, Xu XR. Development prospects and cultivation techniques of the rising blueberry [J]. *Dec Fruits*, 2011 (2): 20-22]
- 4 李丽敏,吴林,郝庆升,李亚东. 中国蓝莓市场现状及产业发展对策研究[J]. 中国果树, 2011 (3): 70-73 [Li LM, Wu L, Hao QS, Li YD. Research of market status and development strategy of blueberry in China [J]. *Chin Fruits*, 2011 (3): 70-73]
- 5 魏殿文. 寒温带蓝莓栽培土壤综合调控研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012 [Wei DW. Study on comprehensive regulation of soils for cultivating blueberry in cold temperate zone [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2012]
- 6 Gaskins MH, Albrecht SL, Hubbell DH. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 1985, **12** (2): 99-106
- 7 Thomas JB, Athony C, Schrollh MN. Beneficial plant bacteria [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1984, **2** (1): 1-20
- 8 Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1995, **41** (2): 109-117
- 9 井大炜,马海林,刘方春,杜振宇,马丙尧. 微生物肥料在经济林中的应用研究现状及展望[J]. 生物灾害科学, 2013, **36** (4): 443-447 [Jing DW, Ma HL, Liu FC, Du ZY, Ma BY. Research status of bio-fertilizers applied in economic forests [J]. *Biol Dis Sci*, 2013, **36** (4): 443-447]
- 10 刘鹏,刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. 农学报, 2013, **3** (3): 26-31 [Liu P, Liu XL. Current research status and prospect of microbial fertilizer in China [J]. *J Agric*, 2013, **3** (3): 26-31]
- 11 刘刊,耿士均,王波,商海燕. 微生物肥料研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, **39** (22): 13445-13447 [Liu K, Geng SJ, Wang B, Shang HY. Research progress of microbial fertilizer [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2011, **39** (22): 13445-13447]

- 12 Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? [J]. *J Microbiol Meth*, 2007, **69** (3): 470-479
- 13 张汉波, 段昌群, 屈良鹄. 非培养方法在土壤微生物生态学研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2003, **22** (5): 131-136 [Zhang HB, Duan CQ, Qu LH. Culture independent methods for studies on microbial ecology of soils [J]. *J Ecol*, 2003, **22** (5): 131-136]
- 14 秦楠, 栗东芳, 杨瑞霞. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, **51** (4): 445-457 [Qin N, Li DF, Yang RF. Next-generation sequencing technology and its application in microbiological research [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2011, **51** (4): 445-457]
- 15 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研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, **30** (15): 256-260 [Lou J, Liu Y, Li T. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, **30** (15): 256-260]
- 16 陈波, 马海林, 刘方春, 杜秉海. 生物有机肥对樱桃生长及根际土壤生物学特征的影响[J]. 水土保持学报, 2013, **27** (2): 267-271 [Chen B, Ma HL, Liu FC, Du BH. Effects of bio-fertilizer on *Cerasus pseudocerasus* growth and rhizosphere soil biological characteristics [J]. *J Soil Water Conserv*, 2013, **27** (2): 267-271]
- 17 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术[M]. 北京: 气象出版社, 2006 [Zheng BS. Research techniques in contemporary plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: China Meteorological Press, 2006]
- 18 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000 [Bao SD. Soil agro-chemistry analysis [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000]
- 19 郝建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 159-160 [Hao JJ, Kang ZL, Yu Y. Techniques in plant physiology [M]. Beijing: Chemical industry publishing house, 2006: 159-160]
- 20 孙磊. 植物营养学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 2012 [Sun L. Experiment of Plant Nutrition [M]. Beijing: Peking University Press, 2012]
- 21 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986 [Guan SY. Soil Enzyme and Its Research Methods [M]. Beijing: Agricultural publishing House, 1986]
- 22 曹丹, 宗良纲, 肖峻, 张倩, 赵妍. 生物肥对有机黄瓜生长及土壤生物学特性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, **21** (10): 2587-2592 [Cao D, Zong LG, Xiao J, Zhang Q, Zhao Y. Effects of bio-fertilizer on organically cultured cucumber growth and soil biological characteristics [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2010, **21** (10): 2587-2592]
- 23 孙运杰, 马海林, 刘方春, 孙蕾, 王君, 刘春生. 生物肥对蓝莓根际土壤微生物学特性及土壤肥力的影响[J]. 水土保持学报, 2015, **29** (3): 167-177 [Sun YJ, Ma HL, Liu FC, Sun L, Wang J, Liu CS. Effects of bio-fertilizer on microbial properties and soil fertility in blueberry rhizosphere soil [J]. *J Soil Water Conserv*, 2015, **29** (3): 167-177]
- 24 张以顺, 黄霞, 陈云凤. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009 [Zhang YS, Huang X, Chen XF. Experimental course of plant physiology [M]. Beijing: Higher education press, 2009]
- 25 刘旭, 王昊, 谭军. 水分胁迫对紫薇生长及生理生化特征的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, **43** (10): 239-241 [Liu X, Wang H, Tan J. Effects of water stress on *lagerstroemia indica* growth and its physiology and biochemistry [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2015, **43** (10): 239-241]
- 26 高彦波, 翟鹏辉, 谭德远. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, **43** (6): 100-101, 183 [Gao YB, Zhai PH, Tan DY. Research progress of relationship between soil enzyme activity and soil fertility [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2015, **43** (6): 100-101, 183]
- 27 张焱华, 吴敏, 何鹏, 余贵连, 吴炳孙, 韦家少. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, **35** (34): 11139-11142 [Zhang YH, Wu M, He P, She GL, Wu BS, Wei JS. Research advance of the relationship between soil enzyme activity and soil fertility [M]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, **35** (34): 11139-11142]
- 28 Girvan MS, Campbel CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation[J]. *Environ Microbiol*, 2005, **7** (3): 301-313
- 29 吴江利, 罗学刚, 李宝强, 司慧. 微生物菌肥作用下荒漠土壤微生物群落结构和功能研究[J]. 中国农学通报, 2015, **31** (9): 216-223 [Wu JL, Luo XG, Li BQ, Si H. Researches on microbial community structure and function in desert soil under microbial fertilizer [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2015, **31** (9): 216-223]
- 30 郭奇峰, 陆扣萍, 毛霞丽, 秦华, 王海龙. 长期不同施肥对农田土壤养分与微生物群落结构的影响[J]. 中国农学通报, 2015, **31** (5): 150-156 [Wu QF, Lu KP, Mao XL, Qin H, Wang HL. Responses of soil nutrients and microbial biomass and community composition to long-term fertilization in cultivated land [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2015, **31** (5): 150-156]
- 31 王菲, 袁婷, 谷守宽, 王正银. 有机无机缓释复合肥对不同土壤微生物群落结构的影响[J]. 环境科学, 2015, **36** (4): 1461-1467 [Wang F, Yuan T, Gu SK, Wang ZY. Effects of organic and inorganic slow-release compound fertilizer on different soils microbial community structure [J]. *Chin J Envir Sci*, 2015, **36** (4): 1461-1467]
- 32 罗欢. 芽孢杆菌对植物的促生和耐盐作用及其相关机制的研究[D]. 江苏南京: 南京农业大学, 2013 [Luo H. Study of growth promoting and salt tolerance of *Bacillus* spp. plant and the research of underling mechanism [D]. Nanjing, Jiangsu: Nanjing Agricultural University, 2013]
- 33 Xia Y, Xu Q, Lin Y, Chen ZZ, Kong FY, Zhang CX. Research progress of mechanism of action of plant growth promoting rhizobacteria [J]. *Agric Sci Technol*, 2014, **15** (1): 87-90, 110
- 34 孙海新. 茶树根际促生细菌的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004 [Sun HX. Studies on plant growth-promoting rhizobacteria of tea rhizosphere [D]. Taian: Shandong agricultural university, 2004]
- 35 康铸慧, 王磊, 郑广宏, 周琪. 微生物产氢研究的进展[J]. 工业微生物, 2005, **35** (2): 41-49 [Kang ZH, Wang L, Zheng GH, Zhou Q. Research progress in hydrogen production microbiological processes [J]. *Ind Microbiol*, 2005, **35** (2): 41-49]
- 36 刘方春, 邢尚军, 马海林, 杜振宇, 马丙尧, 陈波, 杜秉海. PGPR生物肥对甜樱桃 (*Cerasus pseudocerasus*) 根际土壤生物学特性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18** (5): 722-727 [Liu FC, Xing SJ, Ma HL, Du ZY, Ma BY, Chen B, Du BH. Effect of PGPR fertilizer on biological characteristics in *Cerasus pseudocerasus* rhizosphere [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, **18** (5): 722-727]