

复合微生物菌剂对番茄青枯病和土壤微生物多样性的影响

谭兆赞¹, 林捷², 刘可星¹, 廖宗文¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 食品科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用微生物培养和 BIOLOG GN2 微平板培养,研究了施入自制的复合微生物菌剂对番茄青枯病和土壤微生物多样性的影响.平板抑菌试验结果表明,复合菌剂对番茄青枯病菌有一定的拮抗作用;盆栽试验结果显示,施入复合菌剂后,可延缓青枯病发病时间并降低发病率;不同程度地提高了土壤微生物群落的平均每孔颜色变化率(AWCD)和多样性指数;主成分分析表明,施入复合菌剂的处理,在番茄生长中期,土壤微生物群落功能较相似,其菌群特征是对糖类和聚合物优先利用,对羧酸类利用率则较低.

关键词:番茄青枯病;复合微生物菌剂;土壤微生物多样性;BIOLOG

中图分类号:S154.36

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0045-05

Effects of Complex Microbial Fertilizer on Tomato Bacterial Wilt and Soil Microbial Diversities

TAN Zhao-zan¹, LIN Jie², LIU Ke-xing¹, LIAO Zong-wen¹

(1 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Effects of complex microbial fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities were studied by agar media test and BIOLOG GN micro-plate culture. Agar medium antagonistic test showed that pure culture of *Ralstonia solanacearum* were inhibited by compound microbial fertilizer. The pot experiments indicated that the complex microbial fertilizer delayed the disease occurrence time and reduced the disease severity in infested and CK soil, and increased the average well color development (AWCD) and diversity index. The principal component analysis showed that functional diversity of soil microbial community treated with compound microbial fertilizer shift to disease-resistance. The components of carbohydrate and polymer were prior to utilize by soil microbe, while utilization efficiency of carboxylic was low.

Key words: tomato bacterial wilt; compound microbial fertilizer; soil microbial diversity; BIOLOG

番茄细菌性青枯病 *Ralstonia solanacearum* 是一种严重的土传病害^[1],目前尚无理想的防治药物.生物防治一直是解决土传病害的重点研究内容.以往人们多利用无致病力青枯菌或从土壤、植物根际及根内筛选生防菌防治该病,但均存在防效不稳定的问题^[1-3].作为外源微生物的生防菌在新的土壤微生物

态环境中难以快速繁殖扩大,在生态位的竞争中难敌土著微生物,故发挥不出其应有的拮抗作用,防效不稳定.为此,本文从微生态系统考虑,采用复合菌株,根据用途及其作用特性把几种菌株进行优化组合,以期获得较快定殖的复合菌剂,提高土壤微生物多样性,达到较好的防治效果.采用平板抑菌试验和

收稿日期:2006-01-15

作者简介:谭兆赞(1980—),男,硕士研究生;通讯作者:廖宗文(1946—),男,教授,E-mail:zwliao@sohu.com

基金项目:农业部“948”项目(2006-G62);国家863计划“环境友好型肥料研制与产业化”资助项目(2001AA246023);深圳市科技项目(2002-K₁-051)

盆栽试验,研究了自制的复合微生物菌剂对番茄青枯病的影响,并用 BIOLOG GN2 微平板培养,分析其对土壤微生物多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试基本材料 供试番茄品种为红宝石,是青枯病易感品种。供试病土是华南农业大学园艺学院番茄青枯病试验地的连作菜园土(有机质 $32.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $1.594 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 5.47, 碱解氮 $87.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷为 $87.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾为 $355.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 对照土是华南农业大学园艺学院玉米-大豆轮作4年试验地的菜园土(有机质 $22.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $1.438 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 5.68, 碱解氮 $106.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷 $51.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。供试有机肥是番禺青绿公司生产的固体肥(有机质 $369.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全磷 $5.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全钾 $5.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, C/N 为 10.2)。化学肥料用化学纯尿素、氯化钾和磷酸二氢钾。

1.1.2 青枯病菌种与微生物菌剂 青枯病 *Ralstonia solanacearum* 菌种由华南农业大学资源环境学院植物病理研究室提供;微生物菌剂为液体复合菌剂,由地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、产黄纤维单胞菌 *Cellulomonas flavigena*、绿色木霉 *Trichoderma viride*、产阮假丝酵母 *Candida utilis*、酿酒酵母 *Saccharomyces revisiae* 和细黄链霉菌 *Streptomyces microflavus* 等混合液体发酵而成。发酵后其总含菌量不少于 $6.5 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.1.3 主要设备 BIOLOG GN2 微平板,购自美国 BIOLOG 公司(BIOLOG, Hayward, USA);318MIC 型酶标仪,上海三科仪器有限公司生产。

1.2 盆栽试验设计

试验设6个处理(表1)。每处理设4个重复,即4盆。每盆(4 kg 土)种2株番茄。将化学肥料(占总施肥量的60%)及固体有机肥(占总施肥量的20%)作为基肥,与土壤混匀,再与病菌液(含菌量不少于 $5 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)和复合菌剂(含菌量不少于 $6.5 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)一并混匀,倒入瓦盆中,保持一定湿度(30%~50%),让菌种活化1周后移栽。2004年7月12日育苗,7月31日移栽,9月21日收获。移栽34、53 d后取土样分析各处理土壤微生物群落差异。移栽15、34 d后追肥2次,每次追施10%化肥,使所有处理氮、磷、钾的施入量相等,即 N $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, P $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, K $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表1 试验设计

Tab.1 Experiment design $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$

处理 treatment	供试土壤 tested soil	青枯病菌液 fermentation of <i>Ralstonia solanacearum</i>	复合菌剂 complex microbial fertilizer
CK1	病土	0	0
T1	病土	0	30
T2	病土	20	30
CK2	对照土	0	0
CK3	对照土	20	0
T3	对照土	20	30

1.3 测定方法

1.3.1 平板抑菌试验方法 依据赵斌等^[4]的方法进行改良,将番茄青枯病菌制成 $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液,吸取1 mL于培养皿,倒入15~20 mL的营养培养基,3个重复,摇匀。待培养基凝固后,每个平板等距离放入2个牛津杯(不锈钢管,内径6 mm,外径8 mm,高10 mm),使其紧贴培养基表面。各牛津杯均吸入0.2 mL复合菌剂。平板置0℃冷库12 h,让菌剂里的物质充分扩散到下层培养基。置30℃培养箱培养48 h,记录抑菌圈直径。

1.3.2 BIOLOG测定及数据处理 按 Garland 等^[5]和杨永华等^[6]的方法。采用培养96 h的数据,将碳源分为6类,进行主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)^[7]。统计软件应用 SAS Release 8.1。

2 结果与分析

2.1 复合菌剂平板抑菌试验结果及防效

复合菌剂在营养平板上对番茄青枯病菌的抑菌圈直径为2.28 cm,说明复合菌剂对番茄青枯病菌有一定的拮抗作用。较单一真菌的效果^[8]好。表2表明,施入复合菌剂后,能延迟番茄青枯病的发病时间并降低发病株率。

表2 各处理番茄青枯病发病情况¹⁾

Tab.2 Occurrence of tomato bacterial Wilt on different treatments

处理 treatment	移栽后病株数 diseased plants after transplanting					
	13 d	21 d	29 d	30 d	40 d	55 d
CK1	0	1	2	2	4	5
T1	0	0	0	0	1	2
T2	0	0	1	1	2	3
CK2	1	1	2	2	3	4
CK3	0	0	0	2	4	6
T3	0	0	0	0	1	2

2.2 BIOLOG GN2 微平板平均每孔颜色变化率

后期(移栽 53 d)的平均每孔颜色变化率(AWCD)无明显变化规律,故仅对中期(移栽 34 d)AWCD 作图(图 1)。在培养 96 h 后,病土组中, T1 和 T2 的 AWCD 都略高于 CK1。对照土 T3 的 AWCD 略高于 CK2;由于 CK3 施入病菌液,破坏土壤微生态平衡,微生物菌群结构趋于单一,微生物利用不同单一碳底物的种类减少,利用单一碳底物的能力降低,所以其 AWCD 值较 CK2 低。说明施入复合菌剂可改善菌群结构,提高微生物群落多样性,利用单一碳源的能力提高,AWCD 增加。

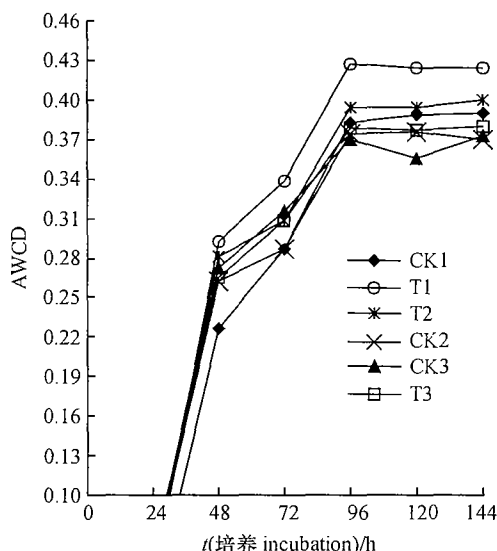


图 1 移栽 34 d 土壤微生物温育过程中 AWCD 变化

Fig. 1 Average well color development (AWCD) changes during incubation of soil microbial community after transplanted 34 d

温育 24 ~ 48 h 时,各处理的土壤微生物群落的 AWCD 值迅速增加。48 ~ 96 h 期间, T1、T2、T3 继续保持较快的增长速度,到 96 h 都到达最大值。Garland 等^[5]认为土壤微生物群落 BIOLOG GN 微平板反应速度和最终能达到的程度与群落内能利用单一碳底物的微生物数目和种类相关。施入复合菌剂的 T1、T2 和 T3 的土壤微生物群落微平板反应速度和最终能达到的程度均高于其他处理,说明其群落中微生物数量与种类较多,反映了该复合菌剂有较强的定殖能力。

2.3 土壤微生物对 6 类碳源利用率的变化

表 3 所示,中期(移栽 34 d)病土组中, T1 和 T2 对糖、聚合物、氨基酸、胺类及其他类的碳源利用率都高于 CK1,对羧酸类的利用率则低于 CK1,且对 6 类碳源的利用率差异较 CK1 小。对照土组的结果与病土组相似, T3 对糖、聚合物、氨基酸及其他类的碳源利用率均高于 CK2 和 CK3,对羧酸类的利用率则低于 CK2 和 CK3; CK3 对胺类、羧酸类和其他类碳源利用率高于 CK2,而对糖和聚合物较 CK2 低,这反映了其优势菌群已发生了变化。

后期(移栽 53 d)病土组中, T1 和 T2 对糖类、聚合物、氨基酸和其他类碳源的利用率都有所降低,对胺类和羧酸类的利用率则增加,更缩小了对 6 类碳源利用的差异,均匀度进一步增加。在对照土组中, CK3 对除聚合物类外的各类碳源的利用率均有增加;但对糖类和聚合物的利用仍低于 CK2。T3 对 6 类碳源的利用率较中期有所降低。

表 3 不同取样时间各处理土壤微生物群落对 6 类碳源的利用率比较

Tab. 3 Use efficiency of different carbon sources by soil microbe from different treatments at different sampling time

t/d	处理 treatment	胺类 amine	氨基酸类 amino acid	糖类 carbohydrate	羧酸类 carboxylic	聚合物类 polymer	其他类 miscellaneous
34	CK1	0.074 ± 0.016	0.317 ± 0.006	0.477 ± 0.003	0.458 ± 0.009	0.532 ± 0.004	0.208 ± 0.015
	T1	0.313 ± 0.036	0.409 ± 0.012	0.522 ± 0.050	0.382 ± 0.039	0.539 ± 0.062	0.341 ± 0.002
	T2	0.302 ± 0.009	0.420 ± 0.048	0.512 ± 0.049	0.341 ± 0.015	0.570 ± 0.015	0.384 ± 0.032
	CK2	0.240 ± 0.046	0.368 ± 0.020	0.473 ± 0.030	0.350 ± 0.001	0.502 ± 0.002	0.218 ± 0.116
	CK3	0.289 ± 0.004	0.371 ± 0.005	0.437 ± 0.070	0.356 ± 0.060	0.478 ± 0.065	0.235 ± 0.007
	T3	0.259 ± 0.014	0.380 ± 0.010	0.485 ± 0.014	0.337 ± 0.015	0.519 ± 0.022	0.288 ± 0.015
53	CK1	0.313 ± 0.007	0.363 ± 0.013	0.468 ± 0.007	0.345 ± 0.007	0.420 ± 0.004	0.329 ± 0.010
	T1	0.310 ± 0.034	0.373 ± 0.001	0.434 ± 0.003	0.346 ± 0.010	0.378 ± 0.008	0.298 ± 0.002
	T2	0.329 ± 0.019	0.389 ± 0.017	0.496 ± 0.009	0.370 ± 0.001	0.473 ± 0.018	0.330 ± 0.000
	CK2	0.240 ± 0.018	0.401 ± 0.001	0.485 ± 0.004	0.352 ± 0.003	0.445 ± 0.004	0.288 ± 0.005
	CK3	0.295 ± 0.048	0.380 ± 0.029	0.461 ± 0.018	0.368 ± 0.035	0.410 ± 0.016	0.331 ± 0.018
	T3	0.274 ± 0.030	0.353 ± 0.022	0.452 ± 0.033	0.318 ± 0.024	0.409 ± 0.028	0.283 ± 0.018

2.4 土壤微生物群落功能主成分分析

通过主成分分析可以在降维后的主元向量空间中,用点的位置直观地反映出不同土壤微生物群落功能多样性变化^[8].从图2可以看出,中期时(图2a),T1和T2都落于PC1轴正端方向,结合表3,T1和T2对糖类和聚合物类的利用率均高于其他处理,由此可知,糖类和聚合物类碳源是引起各处理在PC1轴方向土壤微生物功能差异的主要因素;T1、T2和T3落在PC2正端方向,CK1、CK2和CK3在负端方向,而T1、T2、T3对羧酸类碳源的利用率较其他处理低,可知,羧酸类碳源是引起各处理在PC2轴方向土壤微生物功能差异的因素.结合发病情况,T1、T2和T3的发病率都较低,

施入复合菌剂后,土壤微生物群落功能较相似,并向抗病方向发展,其菌群特征是对糖类和聚合物优先利用,而对羧酸类利用率较低.另外,病土组的各处理分布得较为靠近,基本上分布在第二、四象限对角线的上侧,而对照土组各处理则分布在下侧.由此,同一利用方式土壤的处理其群落功能较相似.

到番茄生长后期(图2b),抗病性较高的处理土壤微生物群落在PCA图中的位置进一步集中,形成较稳定的微生物群落结构.在PC2轴方向上,病土组处理的土壤微生物群落落在PC2正端方向,对照土组各处理在负端方向.由此,再次证明同一利用方式土壤的处理其群落功能较相似.

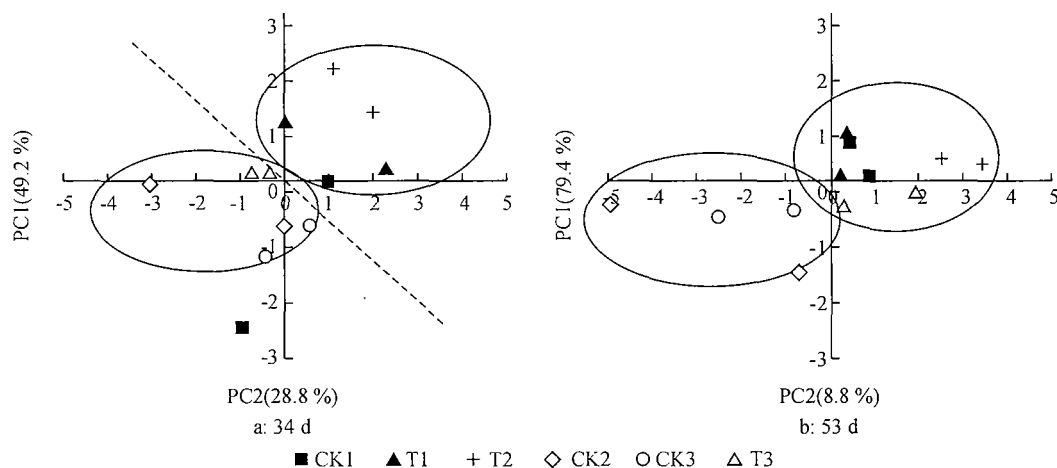


图2 不同取样时间不同处理土壤微生物群落功能主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis on soil microbial community from different treatments at different sampling time

3 讨论

青枯病的发生与土壤环境关系密切,病原菌很难在微生物多样性高的土壤中繁殖^[10],施有机肥能调控土壤微生物群落结构,提高土壤微生物多样性,促进有益微生物的生长,从生态水平上抑制番茄青枯病的发生^[11-12].本文施入的复合菌剂是菌种经筛选后,再按各种菌的特性优化组合而成,有较好的协同效果,对番茄青枯病有较强拮抗作用,可促进土壤微生物菌群向拮抗方向发展,提高生态调控的效果.研究结果表明,土壤病菌基数高低以及防病的复合菌剂的加入与否对防病效果有较大影响,病原菌数量多的T2,其发病情况较病原菌较少的T1和T3略严重.

BIOLOG GN2 微孔板读数前培养时间的长短能显著影响读数结果^[5].单孔的反应随时间而变化,不存在单个最优读数时间,在最短和最长2个极限时间内必须重复读数^[13].一般在培养144 h内每隔24 h读数1次,选择培养72 h的数据进行各种计算

分析^[5-7,11-12].本文采用培养96 h的数据作各种计算分析,是因为在番茄生长中期,各处理土壤微生物培养96 h后对各类碳源利用已达到平衡.

施入复合菌剂后,在番茄生长中期,可不同程度的提高AWCD值,后期差异不再明显.说明在应用BIOLOG研究各处理土壤微生物多样性时不宜在后期取样,而应在较能反映各处理差异的前期及中期取样.

土壤微生物群落对6大类碳源的利用率分析表明,各处理的土壤微生物对糖类和聚合物2类碳源利用率最高,对胺类的利用率最低,这与孔维栋等^[14]的结果相似.微生物对碳源利用率的差异有可能在一定程度上反映土壤微生物群落抗病和感病的差异,值得深入研究.

利用主成分分析方法,结合其他指标,能较好地分离并解释隐含的存在于群落间的功能差异,有利于指示土壤微生物群落功能与防病效果的关系.施入复合菌剂的T1、T2和T3土壤微生物群落功能在

中期较相似,并向抗病方向发展,其菌群特征是对糖类和聚合物优先利用,而对羧酸类利用率较低;而发病率较高的 CK1、CK2 和 CK3 对羧酸类利用率较高,对糖类和聚合物率则较低。后期,发病率较低的处理的土壤微生物群落在 PCA 图中的位置进一步集中,形成较稳定的微生物群落结构。

参考文献:

- [1] 李海涛,邹庆道,吕书文,等. 番茄青枯病的研究进展[J]. 园艺学报, 2001, 28(增刊): 649-654.
- [2] 董春,曾宪铭,刘琼光. 利用无致病力青枯菌株防治番茄青枯病的研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(4): 1-4.
- [3] 黎起秦,罗宽,林伟,等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364-367.
- [4] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 217-219.
- [5] GARLAND J L, MILLS A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2351-2359.
- [6] 杨永华,姚健,华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2000, 20(2): 23-25.
- [7] JULIET P M, LYNNE B, PETER F R. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 42: 1-14.
- [8] 黎起秦,林伟,陈永宁,等. 植物土传病害拮抗真菌的筛选[J]. 西南农业学报, 1999, 12(3): 81-84.
- [9] 席劲瑛,胡洪营,钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- [10] YOSHITAKA Shiomi, MASAYA Nishiyama, TOMOKO Onizuka. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3996-4001.
- [11] 蔡燕飞,廖宗文,董春,等. 番茄青枯病的土壤微生态防治研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(5): 417-420.
- [12] 蔡燕飞,廖宗文,章家恩,等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 349-353.
- [13] 郑华,欧阳志云,方治国,等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456-461.
- [14] 孔维栋,刘可星,廖宗文. 有机物料种类及腐熟水平对土壤微生物群落的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(3): 487-492.

【责任编辑 周志红】

(上接第 30 页)

大于稻壳灰。磷的固定随水分含量增加而增加,灰渣粒径越小对磷的固定率越大。稻壳灰对磷的固定率小于粉煤灰,这和灰渣的化学组成成分不同有关。研究表明, Freundlich 方程可以很好地拟合灰渣中硅的释放速率。在施用灰渣或利用灰渣作复合肥时,稻壳灰更有利于养分的吸附与释放,起到对养分的控释作用。

参考文献:

- [1] 马同生. 我国水稻土硅素养分与硅肥施用研究现状[J]. 土壤学通报, 1990, 18(4): 1-5.
- [2] 魏朝富,杨剑虹,高明,等. 紫色水稻土硅有效性的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1997, 3(3): 229-236.
- [3] 杨剑虹,车福才,王定勇,等. 粉煤灰的理化性质与农业化学行为的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1997, 3(4): 341-348.
- [4] 高明,魏朝富,周保同,等. 含硅熔渣的化学组成特征与农业化学行为研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(2): 220-228.
- [5] 欧阳东,陈楷. 稻壳灰显微结构的研究[J]. 材料科学与工程学报, 2003, 21(5): 648.
- [6] 鲁如坤. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 180-181.
- [7] 冯跃华,邹应斌,胡瑞芝,等. 几种粉煤灰的特性及其硅、磷的农业化学行为研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 341-349.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 70.
- [9] 米铁,陈汉平,吴正舜,等. 生物质灰化学特性的研究[J]. 太阳能学报, 2004, 25(2): 236-241.
- [10] 欧阳东,陈楷. 稻壳灰显微结构及其中纳米 SiO₂ 的电镜观察[J]. 电子显微学报, 2003, 22(5): 390-393.
- [11] 徐明岗,张一平,王锐群. 土壤磷扩散规律及其能量特征的研究: I. 水分、质地、温度及其相互作用对磷扩散的影响[J]. 土壤学报, 1996, 32(2): 148-157.

【责任编辑 李晓卉】