

复合微生物制剂改善土壤生物学特性和防治烟草黑胫病的研究

夏振远¹, 谷医林², 张宏越², 魏海雷^{2*}

(1. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 昆明 650021;

2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:烟草是我国重要的经济作物, 利用微生物制剂改善土壤性质, 防治烟草土传病害是实现绿色防控的重要途径。利用实验室已筛选的多功能有益微生物进行复配, 研究了两种复合微生物制剂 T1 (芽孢杆菌、假单胞菌、不动杆菌) 和 T2 (芽孢杆菌、假单胞菌、鞘氨醇菌) 对土壤理化性质的影响以及对烟草黑胫病的防治效果。结果表明, 与未施用微生物制剂的对照相比, T1 和 T2 均显著提高了土壤脱氢酶、脲酶和蔗糖酶活性, 同时也显著提高了土壤微生物量碳、微生物量氮和土壤呼吸强度, 且 T2 与 T1 相比效果更为突出。制剂 T2 还显著提高了土壤过氧化氢酶活性, 降低了微生物代谢熵, 而 T1 则无显著影响。病害防治试验显示, T1 对烟草黑胫病的防效约 22.7%; T2 的防效显著高于 T1, 达到 76.4%。由此表明, 本研究创制的复合微生物制剂 T2 具有潜在改善土壤生物特性、防治烟草黑胫病的应用价值。

关键词:复合微生物制剂; 烟草黑胫病; 土壤酶活; 生物防治

烟草是我国重要的经济作物, 但是长期以来由于连作和大量化肥的施用, 导致土传病害发生严重, 烟区土壤质量退化, 烟叶品质逐年下降^[1]。烟草黑胫病是由烟草致病疫霉 (*Phytophthora nicotiana*) 引起的一类土传真菌病害^[2]。该病常致烟草矮化、萎焉、叶片发黄、根和茎基部坏死, 是烟草生产中为害最重的病害之一。由于烟草的特殊性, 化学农药防治受到很大限制, 也不能满足绿色生态发展的需求。通过研制兼具土壤营养调控和防病促生的微生物制剂, 改善烟田土壤化学和生物性状, 调控土壤养分的供给和利用率, 控制病害发生发展是实现烟草农业绿色防控、提质增效的重要手段。在最近的研究中, 李倩等^[3]报道了一种微生物制剂的使用可以显著增加土壤细菌、放线菌、自生固氮菌、无机磷细菌和钾细菌的数量, 从而提高了土壤脱氢酶、脲酶和蔗糖酶活性, 并对烟草土传病害有一定防效。另一项研究表明, 施用复合微生物菌剂、腐熟剂和溶磷剂能显著提高烤烟的农艺性状, 上等烟

比例、亩产量、亩产值均显著增加, 其中产值增加可达 32% 以上^[4]。在其他作物中, 复合微生物制剂也同样起到了显著效果。麻耀华等^[5]对不同生育时期的黄瓜施入复合微生物制剂, 根际土壤细菌和放线菌的数量明显增加, 土壤脲酶、蔗糖酶、中性磷酸酶活性提高了一倍以上。由此可见, 筛选和开发复合微生物制剂是一种行之有效的措施。本研究前期已筛选了大量烟草根际微生物, 现通过对效果良好的菌株进行复合筛选和评价, 以期获得兼具土壤调节和防病促生的复合微生物制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 烟草品种

采用生产主栽品种云烟 99。

1.1.2 微生物菌种

采用实验室从北京、云南等地分离保存的根际益生菌芽孢杆菌 S711 (*Bacillus* sp.)、假单胞菌 S1130 (*Pseudomonas* sp.)、鞘氨醇菌 S1191 (*Sphingobium* sp.) 和不动杆菌 S1063 (*Acinetobacter* sp.)。由 S711、S1130、S1063 制备复合微生物制剂 T1, 由 S711、S1130、S1191 制备复合微生物制剂 T2, 活菌含量均为 1×10^9 cfu/mL。

1.1.3 拮抗、解磷、解钾、产酶和生长素检测

对烟草致病疫霉 (*Phytophthora nicotiana*) 的拮抗

收稿日期: 2019-12-13; 录用日期: 2020-01-04

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技计划重点项目 (2017 YN08); 国家重点研发计划课题 (2019YFD1002001); 北京市科技计划项目 (Z191100004019025)。

作者简介: 夏振远 (1971-), 男, 内蒙古宁城人, 研究员, 硕士, 主要从事烟草病理学研究。E-mail: zhenyuanxia@qq.com。

通讯作者: 魏海雷, E-mail: weihaili@caas.cn。

采用对峙培养法^[6]。其他功能检测参考文献[7-10]。

1.1.4 试验设计

试验设3个处理,每个处理3个重复,分别施用复合微生物制剂T1、T2为处理组,每盆加入终浓度为 1×10^8 cfu/g的复合微生物制剂,搅拌均匀,以不施入复合微生物制剂为对照(CK)。移入烟草苗,待4周后伤根接种10 mL 1×10^6 cfu/mL的烟草致病疫霉,15 d后检测记录结果。

1.2 测定方法

1.2.1 土壤酶活性测定

土壤酶活性测定方法参考已发表论文并作部分改进^[11-14]。土壤脲酶活性采用靛酚蓝比色法测定,以每克土24 h产生的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 毫克数表示;蔗糖酶活性采用3,5-二硝基水杨酸比色法测定,以每克土24 h产生的葡萄糖毫克数表示。过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定,以每克土消耗0.1 mol/L KMnO_4 毫升数表示。根际土壤呼吸强度由便携式土壤呼吸分析仪SRS-SD1000测定。采用氯仿熏蒸浸提法提取土壤微生物量碳和微生物量氮,采用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 氧化法测定浸提液中的微生物量碳,采用凯氏定氮法测定微生物生物量氮。利用土壤微生物基础呼吸与微生物量碳的比值计算土壤微生物代谢熵(qCO_2)。

1.2.2 病情指数与防治效果

参照烟草病虫害分级及调查方法^[15],计算病

情指数和防治效果。

病情指数 = $100 \times \Sigma$ (各级病叶数 $\times$ 各级代表值) / (调查总叶数 $\times$ 最高级代表值)

防治效果(%) = (对照病情指数 - 处理组病情指数) / 对照病情指数 $\times 100$

1.3 数据统计

采用SPSS 23.0软件进行统计分析,Duncan's进行差异显著性分析,不同处理间显著差异水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的有益生物学功能

首先对供试菌株进行全面的有益功能检测,结果如表1所示。S711与S1130均对烟草致病疫霉具有显著的抑制作用,而S1191与S1063无此功能。S711无解有机、无机磷、产嗜铁素和生长素的能力,但是该菌株具有很强的产氨、蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的能力。S1130与S711相比,虽不产酶但其解钾、产嗜铁素和生长素能力显著,并具有一定的有机磷分解能力。S1063与其他菌株相比具有突出的分解有机磷的能力,而S1191表现出多种功能,如分解有机磷、无机磷、解钾、产嗜铁素、产氨和生长素以及蛋白酶等特性。由此可见,本研究所采用的菌株具有功能多样性,各自具有独特的有益功能,可以作为复合微生物制剂的备选。

表1 菌株功能特性

菌号	菌种类别	烟草致病疫霉	解有机磷	解无机磷	解钾	产嗜铁素	产蛋白酶	产淀粉酶	产纤维素酶	产氨	产生生长素
S711	<i>Bacillus</i> sp.	++	-	-	+	-	++	++	++	++	-
S1130	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+	-	++	++	++	-	-	++	+
S1063	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	++	+	-	+	-	-	-	+	-
S1191	<i>Sphingobium</i> sp.	-	+	+	+	++	+	-	-	+	+

注: + 代表具有拮抗或产酶活性, - 代表无相关活性。

2.2 土壤酶活性

两种复合微生物制剂(T1、T2)的施用不同程度上影响了根际土壤脱氢酶、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性(表2)。复合微生物制剂T1虽然对土壤酶活性有一定提高,但其作用显著低于复合制剂T2。尤其过氧化氢酶的活性,T2处理后

显著高于对照和T1,而T1对土壤过氧化氢酶无显著影响。复合微生物制剂T2的施用对脲酶和蔗糖酶活性的提高最为显著,其值分别达到1.68和30.32 mg/(g·d)。由此说明制剂T2对调节土壤营养供给具有显著效果。

表 2 复合微生物制剂对土壤酶活性的影响

处理	脱氢酶 [mg/(g·d)]	脲酶 [mg/(g·d)]	蔗糖酶 [mg/(g·d)]	过氧化氢酶 [mL/(g·d)]
CK	0.06 ± 0.01c	0.62 ± 0.03c	13.85 ± 0.82c	9.45 ± 0.67b
T1	0.10 ± 0.02b	1.11 ± 0.03b	23.22 ± 1.21b	9.78 ± 0.87b
T2	0.16 ± 0.03a	1.68 ± 0.02a	30.32 ± 1.33a	12.34 ± 0.76a

注：表中数据为平均值 ± 标准差。小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

2.3 土壤微生物活性

由于复合微生物制剂的施用提高了土壤酶活性，因此推测土壤微生物的活性可能也受到了影响。从图 1 来看，T1 和 T2 均显著提高了土壤微生物量碳、氮和土壤呼吸强度。且 T2 对土壤微

生物活性的影响显著高于 T1。从微生物代谢熵值可以发现，T1 处理没有显著变化，而 T2 显著降低了土壤微生物代谢熵。由此推断复合微生物制剂改善了烟株根际土壤环境，微生物生长与代谢增强。

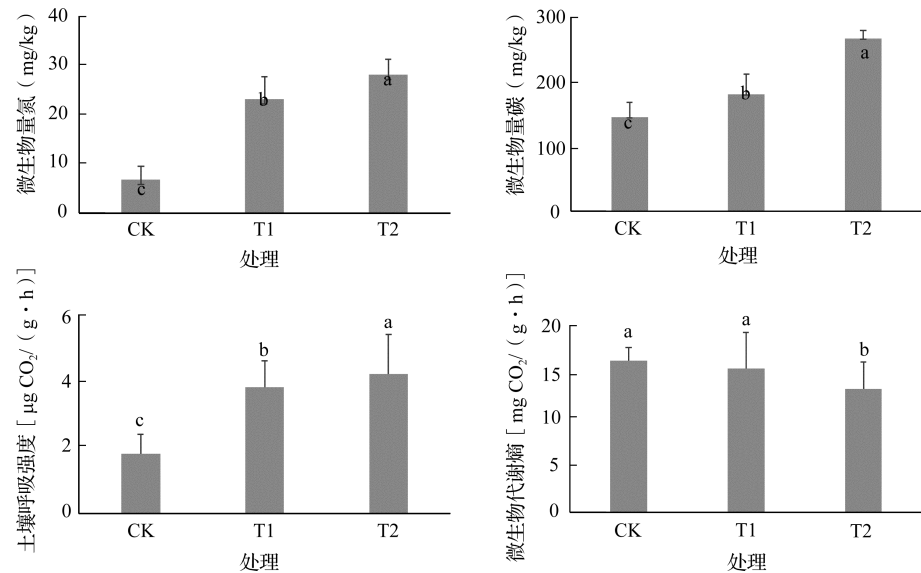


图 1 复合微生物制剂对土壤微生物活性的影响

注：小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.4 黑胫病防治效果

本研究所选用的有益微生物具有多种生防特性，由此检测了各复合制剂对烟草黑胫病的防治效果。接种烟草致病疫霉后 15 d，对照病情指数达到了 73.2%，而施用复合微生物制剂的处理均显著降低了发病率。复合微生物制剂 T1 处理的烟草黑胫病指数为 56.6%，防效仅为 22.7%；制剂 T2 处理后黑胫病指数低于 20%，仅为 17.3%，防效显著高于 T1，达到 76.4%，且经过 3 次独立重复后防效稳定。因此，复合微生物制剂 T2 具有明显的烟草黑胫病防治功能。

表 3 复合微生物制剂对烟草黑胫病的防治效果

处理	病情指数	防效 (%)
CK	73.2 ± 6.8a	—
T1	56.6 ± 8.5b	22.7 ± 7.1b
T2	17.3 ± 5.2c	76.4 ± 8.7a

3 讨论与结论

土壤是植物生长的根基，土壤质量是植物健康生长的重要保证。良好的土壤环境可以增强微生物代谢活动，提高呼吸强度，降低代谢熵，促进碳氮源的利用率。许多土壤有益微生物可通过分泌土壤酶、参与有机质降解和驱动养分循环，改善土壤的理化及生物学性质，并通过拮抗、寄生及溶菌等作用抑制有害病原菌的侵染和繁殖，促进植物健康生长，进而提升作物产量和品质^[16-19]。本研究采用了能够拮抗病原菌、产酶、解磷、解钾、产嗜铁素和生长素的菌株，通过对优良菌株的组合使用，改善了土壤环境，降低了烟草黑胫病的发生，实现了多功能互补。

拮抗作用是当前病害生防菌筛选中的首选指标,也是次生代谢产物中抑制病原菌生长最直观、最简便、最有效的因素^[20]。本研究中的 S711 和 S1130 均具有非常强的抑制烟草致病疫霉的作用,因此在两种复合微生物制剂中均同时使用了这两株菌。其中 S711 属于芽孢杆菌,此类菌代谢广泛,可产生多种抗生素、抗菌肽和水解酶,其根部定殖和环境适应性强,是农业生产中生物农药和微生物肥料的主成分。S711 菌株具备芽孢杆菌特有的拮抗病原菌的能力,以及产氨、产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的能力。S1130 属于假单胞菌,这类细菌营养需求简单,在自然界中广泛存在。尤其在植物根际部分,所筛选到的具有生防活性的细菌绝大部分属于假单胞菌属,代表菌株如 *P. aureofaciens* 30-84, *P. fluorescens* CHA0, *P. klonensis* F113, *P. fluorescens* Q2-87, *P. fluorescens* Pf-5 等^[21-23]。假单胞菌作为生防菌有其自身的优势,它所产生的次生代谢产物种类较多,在植物根围中可以被植物选择性的利用。另外,假单胞菌具有很强的根部定殖能力,很多菌株可产生刺激植物生长的激素,本研究中 S1130 即可产生植物生长素。复合微生物制剂 T1 和 T2 的区别在于第 3 个菌株的选择, T1 选用了 S1063,而 T2 选用了 S1191。S1063 属于不动杆菌,该菌株具有显著的降解有机磷的能力,以及一定的无机磷降解和产氨、产嗜铁素的能力。S1191 属于鞘醇属,除了具备 S1063 的有益功能外,还具有显著的产嗜铁素、蛋白酶和生长素的能力。嗜铁素是一种低分子量但对三价铁高亲和性的螯合物,可以将铁运输到细菌细胞内。嗜铁素造成的铁缺乏环境会阻止真菌孢子的萌发,这种有效的铁吸收机制可能是这些菌株能够与其它微生物竞争而在植物根部有效定殖的重要原因^[24]。复合微生物制剂 T2 中所特有的产水解酶和生长素特性也可能是其改善土壤环境、防治病害的重要因素。已有研究表明,有益微生物产生的蛋白酶、纤维素酶、几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶等真菌细胞壁水解酶在与病原菌相互作用中发挥重要的作用,可对病原菌孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长有强烈的抑制作用^[25-26]。

综上所述,利用复合微生物制剂可以达到改善土壤性质和防治病害的目的。本研究通过对有益微生物筛选和组合后创制的复合微生物制剂 T2 显著提高了土壤酶和微生物活性,降低了烟草黑胫病的

发病率和病情指数,具有潜在改良土壤和防治土传病害的开发价值。

参考文献:

- [1] 张继光,申国明,张久权,等.烟草连作障碍研究进展[J].中国烟草科学,2011,32(3):95-99.
- [2] 王革,李梅云,段玉琪,等.木霉菌对烟草黑胫病菌的拮抗机制及其生物防治研究[J].云南大学学报(自然科学版),2001,23(3):222-226.
- [3] 李倩,张常兴,程玉渊,等.微生态制剂对烤烟连作土壤酶活性及其产量的影响[J].贵州农业科学,2019,47(1):43-48.
- [4] 刘虎.烟田土壤营养调控微生物制剂研制与应用[D].泰安:山东农业大学,2016.
- [5] 麻耀华,尹淑丽,张丽萍,等.复合微生态制剂对黄瓜根际土壤微生物数量和酶活性的影响[J].植物保护,2012,38(2):46-50.
- [6] 张霞,唐文华,张力群.枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害和促进植物生长的作用[J].作物学报,2007,33(2):236-241.
- [7] 戴沈艳,申卫收,贺云举,等.一株高效解磷细菌的筛选及其在红壤性水稻土中的施用效果[J].应用与环境生物学报,2011,17(5):678-683.
- [8] 龚文秀,曹媛媛,倪海婷,等.烟草亲和性解钾 PGPR 菌株筛选及其促生效果研究[J].中国烟草学报,2016,22(1):55-63.
- [9] 柯春亮,陈宇丰,周登博,等.香蕉根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J].微生物学通报,2015,42(6):1032-1042.
- [10] 王奎萍,郑颖,褚光耀,等.解磷、固氮、产吡啶乙酸微生物菌株的筛选及其对植物的促生效果[J].江苏农业学报,2013,29(6):1352-1359.
- [11] 曹慧,孙辉,杨浩,等.土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展[J].应用与环境生物学报,2003,9(1):105-109.
- [12] 邱莉萍,刘军,王益权,等.土壤酶活性与土壤肥力的关系研究[J].植物营养与肥料学报,2004,10(3):277-280.
- [13] 孙冰玉.连作对烟田土壤酶活性、微生物种群数量及土壤理化性质的影响[D].哈尔滨:东北林业大学,2010.
- [14] 关松荫.土壤酶研究方法[M].北京:中国农业出版社,1986.
- [15] 林先贵.土壤微生物研究原理与方法[M].北京:高等教育出版社,2010.
- [16] GB/T 23222-2008[S],烟草病虫害分级及调查方法.
- [17] 邓振山,李军,苏永杰.植物根际促生菌作用机理的研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(10):5844-5846.
- [18] 顾金刚,方敦煌,李天飞,等.荧光假单胞杆菌 RB-42、RB-89 促烟草生长机理初探[J].植物营养与肥料学报,2002,8(4):493-496.
- [19] 刘淑琼,冯妍,于洁.植物根际促生菌的研究进展及其环境

- 作用[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2882-2887.
- [20] 朱忠彬, 吴秉奇, 丁延芹, 等. 短芽孢杆菌 DZQ3 对烟草的促生及系统抗性诱导作用[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(3): 92-96.
- [21] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. 应用生态学报, 2010, 21(1): 232-238.
- [22] Raaijmakers J M, Weller D M, Thomashow L S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments[J]. Environmental Microbiology, 1997, 63: 881-887.
- [23] Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108: 429-441.
- [24] Almario J, Bruto M, Vacheron J, et al. Distribution of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1218.
- [25] Schiessl K T, Janssen E M L, Kraemer S M, et al. Magnitude and mechanism of siderophore-mediated competition at low iron solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin system[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1964.
- [26] 孙晓萌, 公维丽, 李欣, 等. 降解木质纤维素放线菌的功能组学分析及工业应用前景[J]. 中国科学(生命科学), 2017, 47(2): 201-210.

Evaluation of compound microbial agents in management of soil physical and chemical properties and biocontrol of tobacco black shank

XIA Zhen-yuan¹, GU Yi-lin², ZHANG Hong-yue², WEI Hai-lei^{2*} (1. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Kunming Yunnan 650021; 2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Tobacco as the world's most important non-food agricultural crop has great economic importance in China. It is a vital manner for tobacco green management using microbial agents to regulate soil properties and control soil-borne diseases. In this study, four beneficial bacterial strains were used to make two compound microbial agents which were determined the effect on soil physical and chemical properties and tobacco black shank. Agent T1 was composed by *Bacillus* sp. S711, *Pseudomonas* sp. S1130 and *Acinetobacter* sp. S1063 while T2 included *Bacillus* sp. S711, *Pseudomonas* sp. S1130 and *Sphingobium* sp. S1191. Both agents T1 and T2 increased the enzymatic activities of soil dehydrogenase, urease and sucrase, and also improved soil microbial biomass carbon and nitrogen, even the intensity of soil respiration. Importantly, the results indicated that T2 was more efficient than T1. Compared to agent T1, T2 specifically increased the enzymatic activity of catalase and decreased soil microbial metabolic quotient. Agent T2 had a high control efficiency at 76.4% for tobacco black shank, which is significantly higher than treated by T1, which had a very low control efficiency at 22.7%. These results suggest that the compound microbial agent T2 would be potentially used in soil management and biological control of soil-borne diseases.

Key words: compound microbial agent; tobacco black shank; soil enzymatic activity; biological control