

烟草青枯病拮抗菌在有机肥中的定殖效率及田间防治效果

孙立广¹, 张洪春¹, 赵秀云¹, 王 瑞², 向必坤², 彭五星³, 孙玉晓³, 尹忠春³, 谭 军^{2*}

(1.华中农业大学农业生命科学技术学院, 武汉 430070; 2.湖北省烟草公司恩施州公司, 湖北 恩施 445000; 3.湖北省烟草公司宣恩县烟叶分公司, 湖北 宣恩 445000)

摘 要: 为有效防治青枯病, 采用多种拮抗菌复配菌剂添加至生物有机肥, 施用于烟田, 研究其对烟田土壤中有益微生物、病原微生物的影响及对青枯病的控制效果。结果显示, 30%茶枯+70%烟草秸秆粉碎物(生物有机肥 C)中添加的拮抗菌有较好的定殖率, 枯草芽孢杆菌 JK-4、解淀粉芽孢杆菌 JK-10 菌株在生物有机肥 C 中的定殖率分别达到了 945.7%、1970%, 链霉菌 LC-7 菌株在生物有机肥 C 中定殖率达到 496.7%, 同时其防治青枯病的效果最好, 在烟草旺长期防治效果达到 57.40%, 在青枯病发病高峰期防治效果为 37.11%。

关键词: 烟草青枯病; 生物有机肥; 芽孢杆菌; 链霉菌; 防治效果

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119 (2016) 04-0048-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2016.04.009

Colonization Rate of Several Antagonistic Bacteria against Tobacco Bacterial Wilt in Organic Fertilizers and Control Efficacy in Field

SUN Liguang¹, ZHANG Hongchun¹, ZHAO Xiuyun¹, WANG Rui², XIANG Bikun²,
PENG Wuxing³, SUN Yuxiao³, YIN Zhongchun³, TAN Jun^{2*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Enshi Tobacco Company of Hubei Province, Enshi, Hubei 445000, China; 3. Xuanen Tobacco Company of Hubei Province, Xuanen, Hubei 445000, China)

Abstract: For effective prevention and treatment of bacterial wilt, a variety of antagonistic bacterial agents were added to bio-organic fertilizers and applied to tobacco fields. The effects of composite microbial agents added in the bioorganic fertilizers on tobacco beneficial soil microbes, pathogenic microorganisms, and on bacterial wilt control were studied. The results showed that 30%+70% of the dry tea pulverized tobacco stalks (bio-organic fertilizer C) added with antagonistic bacteria had better colonization, with colonization rate of *Bacillus subtilis* JK-4 and *Bacillus amyloliquefaciens* strain JK-10 reached 945.7% and 1970% in the biological organic fertilizer C. The *Streptomyces* strain LC-7 set in bio-organic fertilizer C with a colonization rate of 496.7 percent. The best prevention of bacterial wilt was obtained with this treatment, with a control effect of 57.40% during the fast growing period of tobacco and a control effect of 37.11% at the peak of incidence of bacterial wilt.

Keywords: tobacco bacterial wilt; bio-organic fertilizer; *Bacillus*; *Streptomyces*; control efficacy

烟草青枯病是一种烟草土传病害, 其爆发会造成巨大的经济损失^[1]。为防止青枯病发生, 利用添加拮抗微生物的有机肥防治青枯病正成为研究热点。目前有机肥与功能微生物(生防菌、促生菌等)相结合制成的微生物有机肥对各种土传病害的防控表现出很好的效果^[2-5]。但是单一菌种、单一功能的生防菌已不能满足农业发展的需求。本研究将筛

选获得的多种青枯雷尔氏菌的拮抗菌发酵菌液添加到不同种类的有机肥中, 检测定殖情况; 同时将添加拮抗菌剂的有机肥施用于烟田, 监测烟田土壤中青枯雷尔氏菌及拮抗菌的数量变化以及青枯病发病情况, 筛选出效果最佳的生物有机肥组合, 期望有助于改变目前青枯病生防药剂单一的现状, 获得防治烟草青枯病的新途径。

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目“基于宏基因组学的植烟土壤健康评价研究与应用”(110201402016); 湖北省烟草公司重点项目“烟草秸秆生物有机肥原料多元化研究与开发”(027Y2015-004)

作者简介: 孙立广, 男, 硕士, 研究方向为土壤微生物。E-mail: 18607188382@qq.com。*通信作者, E-mail: 1139560054@qq.com

收稿日期: 2015-07-16

修回日期: 2016-08-03

1 材料与方法

1.1 材料

烟草青枯雷尔氏菌由发病烟草植株分离并在实验室保存。添加的拮抗菌为华中农业大学微生物实验室保存菌株，分别为链霉菌 LC-7 菌株 (*Streptomyces* sp.) 甲基营养型芽胞杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) JK-3 菌株 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) JK-4 菌株，解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) JK-10 菌株，已确认有良好的抑制青枯雷尔氏菌的活性。平板喷雾法：挑取细菌单菌落，点样至 PDA 培养基平板上，倒置放入 28 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后，在平板上喷雾接种对数期的青枯雷尔氏菌，放入 28 °C 培养箱，24 h 后观察是否有抑菌圈。

设置的 5 种有机肥处理由湖北省恩施州烟草公司提供，分别为生物有机肥 A：100%烟草秸秆粉碎物；B：30%菜枯+70%烟草秸秆粉碎物；C：30%茶枯+70%烟草秸秆粉碎物；D：30%菜枯+30%炭化谷壳+40%烟草秸秆粉碎物；E：30%茶枯+30%炭化谷壳+40%烟草秸秆粉碎物。

田间试验在宣恩县晓关乡古路村进行，选择烟草青枯病发生严重的黄棕壤进行试验，供试品种为云烟 87。

1.2 试验设计

1.2.1 拮抗菌共培养试验 采用平板对峙法，将拮抗菌分别点接在平板上，点接距离 2 cm，在培养箱中恒温培养 5~7 d，观察菌株生长是否会互相影响。

1.2.2 拮抗菌在有机肥中的定殖和存活率测定 5 种不同有机肥分别在 121 °C 高温灭菌 30 min。将培养的 4 种拮抗菌菌株发酵液按 10% (V/W) 的接种量分别加入到灭菌有机肥中，放置于 37 °C 培养箱中，每天手动摇翻来进行混匀，3 d 后，取发酵的有机肥 10 g，溶于 90 mL 无菌水中，系列梯度稀释，选择合适稀释度涂布牛肉膏蛋白胨培养基或高氏一号培养基平板，培养 3~5 d 后，计算单菌落数量，计算每种拮抗菌在有机肥中的含菌量。

1.2.3 将拮抗菌加入有机肥进行二次发酵 将各个功能菌的菌株发酵液 (10^9 CFU/mL) 按 1% (V/W) 的量分别加入到腐熟好的生物有机肥 A-E 中，固体发酵，发酵温度 30~45 °C，发酵过程中每天翻堆一次，发酵 5~7 d。分别将各个菌固体发酵获得的菌剂等体积混合，并后熟 2~3 d，后熟过程中翻堆 2 次，最后在温度不超过 60 °C 的条件下将微生物有机肥的含水量蒸发至 50% 左右。获得含有拮抗菌的生物有机肥 BOF A-E。

1.2.4 田间施用生物有机肥 分别以施用 5 种不同生物有机肥 (BOF A-E) 为 5 个处理，每个处理重复 3 次，每个小区植烟 60 株。移栽前将 BOF 肥料施于土壤中，施用量为 200 g/株。同时以施用 100% 化肥的处理作为对照，养分差均用化肥补齐。所有处理氮磷钾的施入总量相等。生物有机肥 A-E 施用量为 200 g/株，移栽前均匀施撒于田间；移栽后的 30 和 60 d，使用拮抗菌稀释 5 倍的发酵液灌根处理，每株 100 mL，肥料所施小区分别标记为 SF-1—SF-5。按常规施肥量施化肥，不使用有机肥，作为对照组，所施小区标记为 SF-6。

1.2.5 病情调查 自移栽后出现第 1 株发病植株起，每隔 15 d 详细调查病情状况，并记录直至烟草成熟期。青枯病的病情指数按照中华人民共和国烟草行业标准烟草病害分级及调查方法调查。烟草青枯病的发病率、病情指数和防治效果按下式计算：

$$\text{发病率} = \text{发病植株} / \text{调查植株总数} \times 100\%$$

$$\text{病情指数} = \sum[(\text{病情级数} \times \text{此级株数}) / (\text{最高级数} \times \text{总株数})] \times 100$$

$$\text{防治效果} = (\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100\%$$

1.2.6 烟田青枯雷尔氏菌和拮抗菌数量的检测 分别在田间施用有机肥 30, 60, 90 d 后以及青枯病发病高峰期取土壤样品，带回实验室，10 倍系列梯度稀释后，涂布在 TTC 培养基上，培养后计算青枯雷尔氏菌的数量。同时分别用高氏一号培养基和 NA 培养基培养后，计算放线菌和芽胞杆菌的数量。

2 结果

2.1 拮抗菌共培养试验

如图 1 所示,平板上的不同菌株在生长中并不会相互产生明显的抑制作用,所有菌株的共培养试验均显示各个拮抗菌之间的生长并不会相互产生影响。

2.2 拮抗菌在有机肥中的定殖

从表 1 可以看出,拮抗菌株在大部分有机肥中的定殖率均比较高,均显示了较好的定殖结果。从总体来看,有机肥 C 的定殖结果最好,所有拮抗菌都有较高的定殖率,其中 JK-3 的定殖率达到了 4595%,JK-3 的定殖率在所有组别中最高。其次有有机肥 B 与有机肥 E 也有较好的定殖结果,但在这两

种肥料中,LC-7 的定殖率则明显低于有机肥 C。在有机肥 A 与有机肥 D 中,3 种细菌的定殖率都比较高,但 LC-7 却不能在其中很好的定殖。可见,在拮抗菌定殖试验中,有机肥 C 可以很好地促进各拮抗菌的生长,其次是有机肥 B 与有机肥 E。

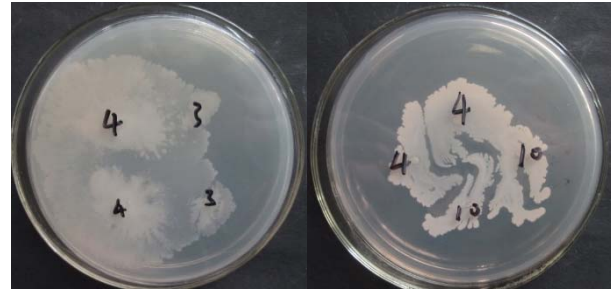


图 1 拮抗菌共培养结果

Fig. 1 Antagonistic bacteria co-culture results

表 1 拮抗菌株在 5 种生物有机肥中的定殖

Table 1 Colonization of antagonistic strains in five bio-organic fertilizers

有机肥	有机肥 A	有机肥 B	有机肥 C	有机肥 D	有机肥 E	发酵液
JK-10 含菌量/ ($\times 10^{11}$ CFU·g ⁻¹)	32	58	197	163	164	10
JK-10 定殖率/%	320	580	1970	1630	1640	-
JK-4 含菌量/ ($\times 10^{11}$ CFU·g ⁻¹)	100	61	870	670	85	92
JK-4 定殖率/%	108.7	66.3	945.7	728.3	92.4	-
JK-3 含菌量/ ($\times 10^{12}$ CFU·g ⁻¹)	2100	1600	1700	2000	1600	37
JK-3 定殖率/%	5676	4324	4595	5405	4324	-
LC-7 含菌量/ (CFU·g ⁻¹)	-	2×10^5	149×10^5	-	5×10^5	3×10^6
LC-7 定殖率/%	-	6.67	496.7	-	16.7	-

2.3 土壤中青枯雷尔氏菌和拮抗菌的检测

分别在移栽后 30、60、90 d 以及青枯病发病高峰期进行采样检测。

2.3.1 土壤中青枯雷尔氏菌数量 从表 2 可以看出,在发病高峰期,添加拮抗菌和生物有机肥的 5 个小区土壤中青枯雷尔氏菌数量明显少于对照组的数量,其中 SF-1 处理组土壤中的青枯雷尔氏菌数量最少。处理组 SF-1 在各个时期土壤青枯雷尔氏菌数量如图 2 所示,由于青枯雷尔氏菌在各个土样中不同时期含量的变化波动范围较大,纵坐标采用菌含量的对数值。可以看出在 30 至 90 d 青枯雷尔氏菌在土壤中的含量呈上升趋势,但 90 d 至发病高峰期明显下降,说明添加拮抗菌的有机肥在生长后期可以抑制烟田土壤中青枯雷尔氏菌的生长。可见 5 种添加了拮抗菌剂的有机肥均可以有效地降低土

壤中青枯雷尔氏菌的数量,预防青枯病的发生。

表 2 不同处理发病高峰期土壤中青枯雷尔氏菌数量

Table 2 The number of *Ralstonia solanacearum* in different soil samples in peak period

项目	SF-1	SF-2	SF-3	SF-4	SF-5	SF-6
青枯雷尔氏菌数量/ ($\times 10^6$ CFU·g ⁻¹)	4	7	12	12	18	106

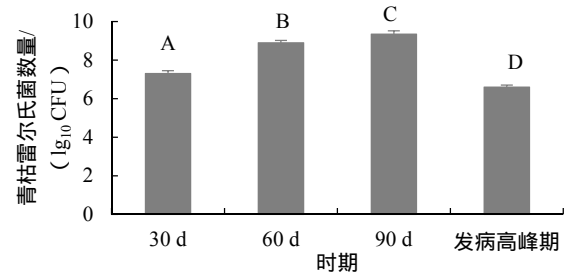


图 2 SF-1 处理不同时期土壤中青枯雷尔氏菌数量

Fig. 2 The number of *R. solanacearum* in different periods in SF-1 soil

2.3.2 土壤中拮抗菌的跟踪监测 土壤中链霉菌 LC-7 的检测结果如图 3。在发病高峰期，SF-3 处理组检测到的菌含量最高，同时期 SF-3 处理组的青枯雷尔氏菌数量明显少于对照组，能很好的抑制青枯雷尔氏菌的生长。放线菌能产生多种抗生素，对抑制土壤中病原菌的繁殖起到了关键作用。放线菌数量最高的 SF-3 土样各个时期的放线菌数量如图 4 所示。在发病高峰期，放线菌数量明显增加，这有利于抑制土壤中病原菌的生长和繁殖。

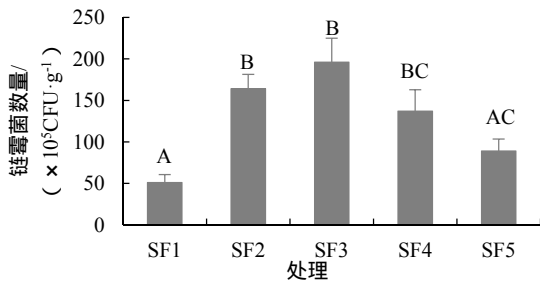


图 3 不同处理发病高峰期土壤中链霉菌数量
Fig. 3 The number of *Streptomyces* strain LC-7 peak period in soil samples

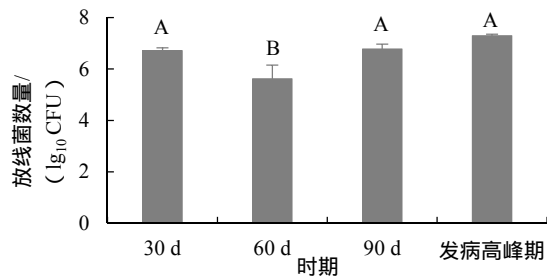


图 4 SF-3 处理不同时期土壤中放线菌数量
Fig. 4 The number of *Actinomycetes* in different periods in SF-3 soil

发病高峰期不同处理组土壤中的芽胞杆菌含量结果如图 5 所示，其中 SF-1 处理组含菌量最多，达到了 8.9×10^8 CFU/g 土，其他处理组芽胞杆菌的含量也基本保持在相同的水平，都达到了 10^7 这个数量级。含菌量最多的 SF-1 处理组各个时期芽胞杆菌的数量如图 6 所示，相比于 90 d 时，发病高峰期芽胞杆菌的数量有所下降，但仍维持在一个较高的水平。

2.4 青枯病田间防治效果

对各个处理在不同时期的青枯病发病情况进行了调查并统计，结果见表 3。从表中可以看出，5

种添加了拮抗菌剂的有机肥均可以抑制烟草青枯病。在团棵期，对照组的发病率为 53.70%，而处理组中最高发病率为 38.89% (SF-5)，最低只有 24.07% (SF-3)。随着时间推移，处理组的防效略有下降。在成熟期，最高的防治效果为 SF-3 处理组，防效达到了 37.11%。

随着进入发病高峰期，各个小区内的烟草发病率都呈上升的趋势。如图 7 所示，施用生物有机肥 C 的 SF-3 土样，在各个时期发病率都低于其他处理组，表现出较好的抗病能力。

各处理组的防治效果如图 8 所示，施用有机肥土样的烟草在初期防治效果均超过了 30%，随着烟

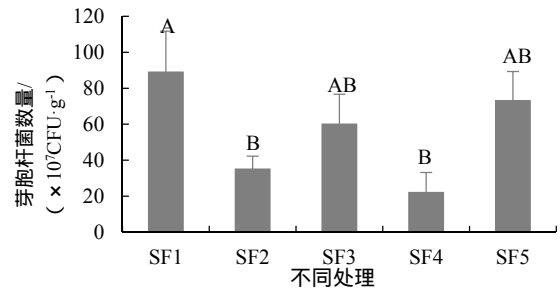


图 5 不同处理发病高峰期土壤中芽胞杆菌数量
Fig. 5 The number of *Bacillus* in peak period in different soil samples

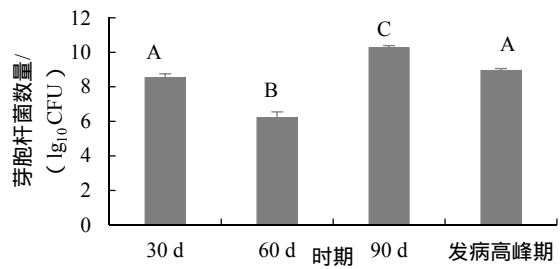


图 6 SF-1 处理不同时期土壤中芽胞杆菌数量
Fig. 6 The number of *Bacillus* in different periods in SF-1 soil

表 3 田间试验中各时期青枯病发病率和防治效果 %
Table 3 The incidence and control efficacy of bacterial wilt at different periods in field experiments %

处理	团棵期		旺长期		成熟期	
	发病率	防治效果	发病率	防治效果	发病率	防治效果
SF-1	37.96	29.31	62.04	12.99	73.15	18.56
SF-2	33.33	37.93	40.74	42.86	62.96	29.9
SF-3	24.07	55.17	30.37	57.4	56.48	37.11
SF-4	32.41	39.66	38.7	45.72	69.44	22.68
SF-5	38.89	27.59	54.63	23.38	68.52	23.71
SF-6	53.7	-	71.3	-	89.82	-

草的生长，施用不同有机肥的土样在烟草生长过程中表现出了不同的变化趋势，随着发病高峰期的到来，防治效果有所下降但仍保持在一定水平，其中生物有机肥 C 在高峰期防治效果最佳，达到 37.11%。

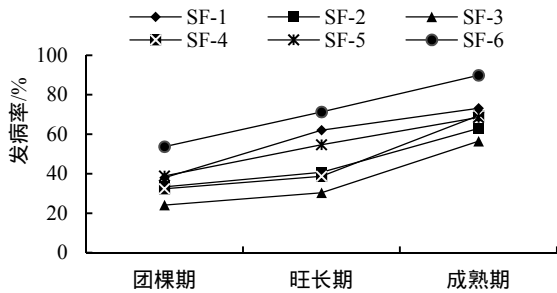


图 7 田间试验中烟草各时期青枯病的发病率
Fig.7 The incidence of tobacco bacterial wilt in field experiments in different periods

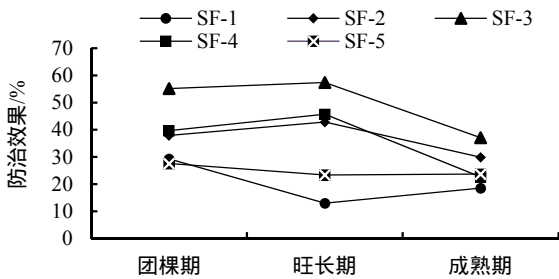


图 8 田间试验中生物有机肥对青枯病的防治效果
Fig. 8 The control efficacy of bio-organic fertilizers on tobacco bacterial wilt in field experiments

3 讨论

生物有机肥可以促进土壤养分的释放，增加土壤肥力，利于植物的吸收，同时产生的抑菌物质和生长调节因子可以有效地抑制植物病虫害的发生并促进植物稳健生长^[6]。生物有机肥的防病效果，已经突破了它传统上增加肥力作用，受到了广泛的关注^[7-8]。

研究了 5 种不同生物有机肥添加复合拮抗菌剂后对烟草青枯病的防治效果发现，添加了复合拮抗菌剂的生物有机肥都能够减少土壤中青枯雷尔氏菌的数量，同时一定程度上减少了烟草青枯病的发生，虽然随着时间推移各处理组青枯病发病率呈上升趋势，但在发病高峰期仍表现出稳定的防效，其中，SF-3 处理组在发病高峰期对青枯病防治效果最高，达到 37.11%。生物有机肥由于添加了烟草青枯

菌复合拮抗菌剂，包括芽孢杆菌、链霉菌等^[9-13]，这些有益菌在土壤中定殖并大量繁殖后，可以在烟草植株的根际成为优势菌株，产生的抗生素类物质对病原菌具有一定的抑制作用，因此可以减少青枯病的发病。其中芽孢杆菌通过空间和营养位点竞争、产生抗菌物质、溶菌作用以及诱导植物产生抗性几种方式综合达到防治效果^[14]，而链霉菌则会产生抗生素^[15]。徐福乐等^[16]利用添加复合菌剂的生物有机肥对番茄青枯病的防治效果达到了 69%，另外添加的有益菌还会分泌多种代谢产物，有助于烟草的生长，提高抗病能力^[17-18]。除此之外生物有机肥还会增加烟草植株过氧化物酶等酶活性的提高，增强抵御病虫害的能力，降低病害的发生^[19]。试验中观察各处理组的发病情况，可以明显看出与对照组相比，各处理组的发病时间均向后推迟，施用有机肥 C 的 SF-3 土样在烟草旺长期的发病率为 30%，大大低于对照组的 71%。丁传雨等^[20]的研究也发现生物有机肥能够延缓青枯病的发病时间。

生物有机肥中添加的有益菌无毒害，不污染环境，成功定殖后可以长期发挥作用，而且可以改变土壤中的微生物群落结构^[21]，使病原菌数量减少，同时生物有机肥能够提供植株生长所需的各种微量元素和大量有机物质，提高土壤供肥能力。施用生物有机肥对改善土壤质量^[22]，提高土壤更新恢复能力，防治土传病害具有十分重要的意义^[23-24]。

4 结论

施用的 5 种生物有机肥可以在一定程度上降低青枯病的发病率。拮抗菌定殖率、发病率统计等结果说明，有机肥 C 为最佳的有机肥配比，最适宜拮抗菌定殖，可以较好地防治青枯病。生物有机肥的使用将对保护环境，提高烟草产量，保证烟草产业健康发展做出贡献。其施用方式与施用量还需进一步研究。

参考文献

[1] 彭细桥, 刘红艳, 罗宽, 等. 烟草内生青枯病拮抗细菌的筛选和初步鉴定[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2): 38-40.

- [2] 刘艳霞,李想,曹毅,等. 抑制烟草青枯病型生物有机肥的田间防效研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(5): 1203-1211.
- [3] 刘添毅,李春英,熊德中,等. 烤烟有机肥与化肥配合施用效应的探讨[J]. 中国烟草科学, 2000, 21(4): 23-26.
- [4] 王军,詹振寿,谢玉华,等. 施用生物有机物对烤烟生长发育的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3287-3288.
- [5] 刘国顺,刘韶松,贾新成,等. 烟田施用有机肥对土壤理化性状和烟叶香气成分含量的影响[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(3): 29-33.
- [6] 谭兆赞,徐广美,刘可星,等. 不同堆肥对番茄青枯病的防病效果及土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(2): 10-14.
- [7] 赵娜,蔡昆争,汪国平,等. 家畜堆肥诱导番茄对青枯病的抗性及其生理机[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 2058-2063.
- [8] 吴建峰,林先贵. 我国微生物肥料研究现状及发展趋势[J]. 土壤, 2002(2): 68-72.
- [9] 易有金,尹华群,罗宽,等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 301-306.
- [10] 林东,徐庆,刘艺舟,等. 枯草芽孢杆菌 S0113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 77-80.
- [11] 胡剑,赵永歧,王岳五,等. 枯草杆菌 Bs-98 分泌的抗真菌蛋白的分离纯化及其部分性质的研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(1): 3-6.
- [12] 顾真荣,吴畏,高新华,等. 枯草芽孢杆菌 G3 防治植病盆栽试验[J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 77-80.
- [13] 王雅平,刘伊平,潘乃穉,等. 枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产效应的研究[J]. 生物防治通报, 1993(9): 63-68.
- [14] 陈志谊,张荣胜. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 999-1006.
- [15] 李文均,职晓阳,唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873.
- [16] 徐福乐,纵明,杨峰,等. 生物有机肥的肥效及作用机理[J]. 耕作与栽培, 2005(6): 8-9.
- [17] 陈志. 烟草多抗生物有机肥对病虫害防治效果及烟株生长的影响[J]. 现代农业科技, 2009(2): 131-132.
- [18] 葛均青,于显昌,王竹红,等. 微生物肥料效应及其应用展望[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 87-88.
- [19] 杨云高,王树林,刘国. 生物有机肥对烤烟产质量及土壤改良的影响[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(4): 70-74.
- [20] 丁传雨,乔焕英,沈其荣,等. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2): 239-245.
- [21] Hoitink H A, Boehm M J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon[J]. Annu Rev Phytopathol, 1999, 37: 427-446.
- [22] 邵孝侯,刘旭,周永波,等. 生物有机肥改良连作土壤及烤烟生长发育的效应[J]. 中国土壤与肥料, 2011(2): 65-67.
- [23] Hu S J, van Bruggen A H C, Grunwald N J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil[J]. Appl Soil Ecol, 1999, 13: 21-30.
- [24] 刘更另,金维续. 中国有机肥料[M]. 北京:农业出版社, 1991: 242.