

生物有机肥对烟草青枯病的防效及对土壤细菌群落的影响

施河丽¹, 孙立广², 谭 军¹, 赵秀云², 王 瑞^{1*}

(1.湖北省烟草公司恩施州公司, 湖北 恩施 445000; 2.华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘 要: 烟草青枯病是一种危害严重的土传性病害, 为了防治烟草青枯病, 筛选了3株拮抗青枯雷尔氏菌的芽孢杆菌(甲基营养型芽孢杆菌 JK3、枯草芽孢杆菌 JK4 和解淀粉芽孢杆菌 JK10), 将其发酵液添加到有机肥中, 经二次发酵后获得生物有机肥(SF2、SF4), 施入烟田。结果表明, 生物有机肥能较好地防治烟草青枯病, 同时促进烟株的生长, SF2、SF4 处理的防效分别为 82.18%、68.82%。同时, 采用高通量测序技术分析了土壤细菌的群落结构, 发现生物有机肥显著影响了土壤细菌的群落结构, 促进了土壤中有益菌(如鞘氨醇单胞菌属、类芽孢杆菌属、耐热芽孢杆菌、梭菌属等)的增殖。芽孢杆菌和链霉菌的数量也明显增加, 推测链霉菌和芽孢杆菌可抑制青枯雷尔氏菌的繁殖, 进而控制烟草青枯病的发生。施用添加拮抗芽孢杆菌的生物有机肥是防治烟草青枯病的一项有效措施。

关键词: 青枯雷尔氏菌; 生物有机肥; 芽孢杆菌; 土壤细菌群落; 高通量测序

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119(2018)02-0054-09

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2018.02.008

Control Efficiency of Bio-organic Fertilizers on Tobacco Bacterial Wilt and Their Effects on Soil Bacterial Community

SHI Heli¹, SUN Liguang², TAN Jun¹, ZHAO Xiuyun², WANG Rui^{1*}

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

Abstract: Tobacco bacterial wilt is a severe soil-borne disease. In order to control tobacco bacterial wilt, we isolated and selected *Bacillus methylotrophicus* strain JK3, *B. subtilis* strain JK4, and *B. amyloliquefaciens* strain JK10 which exhibited strong antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*. Fermentation solutions of these three antagonistic strains were added to organic fertilizers to make bio-organic fertilizers (SF2, SF4). Bio-organic fertilizers were applied to the field to control bacterial wilt. The results showed that after application of bio-organic fertilizers tobacco bacterial wilt was effectively controlled. The control efficiency of SF2 and SF4 treatments were 82.18% and 68.82%, respectively. We analyzed the soil bacterial community through high-throughput sequencing technology. It was found that the soil bacterial community changed dramatically after application of bio-organic fertilizers. Compared to the control, the abundance of beneficial bacteria including *Sphingomonas* spp., *Paenibacillus* spp., *Thermobacillus* spp., and *Clostridium* spp. significantly increased in the SF2 and SF4 treated soils. Abundance of *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. also increased noticeably after the application of bio-organic fertilizers. *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. might inhibit the growth of *R. solanacearum*. Our results indicated that bio-organic fertilizers added with antagonistic *Bacillus* spp. could effectively control tobacco bacterial wilt.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*; bio-organic fertilizers; *Bacillus*; soil bacterial community; high-throughput sequencing

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)感染引起的毁灭性烟草病害。青枯雷尔氏菌是一种土传病原细菌, 致病力强, 寄主范围广, 分布广泛。人们采用多种拮抗菌如芽孢杆菌、放线菌、假单胞菌等来防治青枯病^[1-2], 但由于这些

拮抗菌施入土壤中后, 不能很好地在土壤中定殖, 造成其防效不稳定。此外, 有机肥被广泛用于控制土传病害^[3], 研究表明, 土壤中添加有机肥后, 青枯雷尔氏菌的数量显著降低^[4]。由此, 人们尝试将有机肥与拮抗菌两者相结合研制具有抗病性的生

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)

作者简介: 施河丽(1984-), 女, 硕士, 研究方向为烟草栽培与微生物工程。E-mail: 154518720@qq.com。*通信作者, E-mail: 100689575@qq.com

收稿日期: 2017-10-23

修回日期: 2018-01-04

物有机肥,拮抗菌在有机肥中大量繁殖,并以有机肥为载体,施用于田间后,能更好地抑制病原菌的繁殖,从而达到控制土传病害的目的。

目前,生物有机肥施入土壤后,对土壤微生物群落结构的影响也是一个研究热点。土壤微生物在土壤有机质的降解、土壤养分(C、N、P、S)的循环中发挥着重要作用,对植物的健康生长至关重要^[5]。人们对土壤微生物的了解主要通过纯培养土壤微生物,并进行鉴定分析。然而,能够通过纯培养获得的微生物只占土壤微生物的 1%,绝大多数微生物是不可培养的^[6]。而基于高通量测序技术的宏基因组学是一项崭新的研究土壤微生物的技术^[7],能够更加深入全面地研究各种农业措施对土壤微生物的影响^[8-9]。

本研究筛选了 3 株拮抗青枯雷尔氏菌的芽孢杆菌(甲基营养型芽孢杆菌 JK3、枯草芽孢杆菌 JK4、解淀粉芽孢杆菌 JK10),添加至有机肥后配制成抗病的生物有机肥,用于控制烟草青枯病。此外,为了研究生物有机肥施入田间后对土壤微生物群落结构的影响及其作用机制,采用高通量测序技术对土壤细菌的群落结构进行分析^[10],研究施用生物有机肥后土壤细菌种群和丰度的改变,对深入了解生物有机肥的作用机制有着重要意义,也为烟草青枯病的生物防治提供一条有效途径。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

前期研究中,从湖北省恩施州健康烟株的根际土壤中分离筛选了对青枯雷尔氏菌具有较强抑菌活性的 3 个芽孢杆菌菌株:甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) JK3、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) JK4、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JK10,保存于实验室,备用。

1.2 拮抗芽孢杆菌在有机肥中的定殖

分析 3 株芽孢杆菌在不同种类的有机肥中的定殖率。按组成成分分别配制 5 种不同有机肥 A、B、C、D、E,121 °C 高压灭菌 30 min。分别接种 JK3、JK4、JK10 的单菌落至牛肉膏蛋白胨液体培养基中,

37 °C,210 r/min 震荡培养 48 h,通过稀释涂布,测发酵液的含菌量。将 3 株拮抗菌发酵液分别按 1/10 (V/m) 的接种量混合加入到灭菌的 100 g 有机肥中(放于 500 mL 三角瓶),含水量为 60%,于 37 °C 恒温培养,每天手动摇翻、混匀。7 d 后,取发酵后的有机肥 10 g,溶于 90 mL 无菌水中,系列梯度稀释,稀释液涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板,培养 2~3 d 后,计算单菌落数量。拮抗菌在有机肥中的增殖率计算方法为:(有机肥中的含菌量/发酵液的含菌量) × 100%。

1.3 生物有机肥的二次固体发酵

选择芽孢杆菌定殖率高的 2 种有机肥(有机肥 C、有机肥 D),进行二次固体发酵,获得抗青枯病的生物有机肥。

将 JK3、JK4、JK10 菌株分别用发酵培养基(1.2% 豆粕粉,0.2% NH₄NO₃,0.2% Na₂HPO₄,1.5% 淀粉),于 210 r/min 振荡培养 48 h,通过稀释涂布,测发酵液的含菌量。将发酵液中菌体浓度调整到 1 × 10⁹ CFU/mL,分别按照 1/10 (V/m) 的接种量添加至有机肥 C 或有机肥 D 中进行二次固体发酵,室温固体发酵,当发酵堆肥的中心温度接近 45 °C 时,进行翻堆,发酵 7 d。最后将含单株拮抗菌的 3 种有机肥按 1 1 1 的体积进行混合,并后熟 2~3 d,后熟过程中翻堆 2 次。摊开使有机肥中水分挥发,控制生物有机肥的含水量为 30% 左右。经测定,生物有机肥 C 的营养含量为:45.86% 有机质,1.96% N,1.43% P₂O₅,3.38% K₂O。生物有机肥 D 的营养含量为:43.34% 有机质,2.33% N,2.75% P₂O₅,6.79% K₂O。将配制好的生物有机肥在室温下保存 4 个月,经稀释涂布测定芽孢杆菌含量。

1.4 生物有机肥防治烟草青枯病效果田间试验

试验田位于湖北省宣恩县椒园镇凉风村,为烟草青枯病发病严重地块(前季发病率为 42%)。设置 4 个处理:处理 SF2,生物有机肥 C;处理 SF4,生物有机肥 D;处理 SF7,不添加拮抗菌 JK3、JK4、JK10 的有机肥 C,做为有机肥对照;处理 SF8,化肥[m(N) m(P₂O₅) m(K₂O)=1 1.5 2.5],施氮量

为 97.5 kg/hm²。SF2、SF4 和 SF7 处理均按 200 g/株将有机肥做为基肥，在移栽前穴施到烟株根际周围，与 SF8 处理的 N、P、K 差量均用化学肥料补齐。每个处理 3 个小区，随机区组排列，每个小区种植 60 株烟苗。

移栽后 2 个月，测量和调查各处理中烟株的茎围、株高、青枯病发病率和病情指数。病情指数(DI)和防治效果 (BE) 按照下列公式计算^[11]：

$$DI = [(\text{该病级株数} \times \text{病级指数}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高病级指数})] \times 100$$

$$\text{防治效果} = [(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数}] \times 100\%$$

1.5 土壤样品的采集和 DNA 提取

分别在移栽后 0、60、120 d，通过五点采样法采集烟草根际土壤（采样深度为 0~15 cm），将土样混匀后保存在 -80 °C。采用 FastDNA™ SPIN kit（MP Biomedicals, Santa Ana, CA）试剂盒提取土壤微生物基因组 DNA。利用正向引物 338F（5'-ACTCCT ACGGAGGCAGCA-3'）和反向引物 806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）扩增细菌 16S rDNA 的 V3-V4 可变区。PCR 反应体系为：0.4 μL FastPfu polymerase，4 μL 5 × Fastpfu buffer，0.8 μL 338F primer（5 μM），0.8 μL 806R primer（5 μM），10 ng 土壤微生物 DNA 模板，加 ddH₂O 至总体积为 20 μL。反应条件为：95 °C 变性 3 min，95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 45 s 进行 27 次循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 产物采用 Agencourt® AMPure XP Beads（Beckman, Brea, CA）进行纯化。扩增产物用于构建文库，文库采用 MiSeq sequencer（Illumina）

测序仪，在上海伯豪生物技术有限公司进行高通量测序分析。

1.6 土壤细菌群落结构分析

原始数据采用 FASTX Toolkit 0.0.13 软件包进行分拣，去除 Q20<50%的片段、末端低质量的碱基（Q20 值<20），并去除长度小于 35 bp 的片段。有效 reads 进行以下分析：

OTU（Operational Taxonomic Units）聚类 and 细菌丰度分析：将序列进行聚类，高相似性（97%）的序列归为同一类，即为一个 OTU^[12]。OTU 的产生采用 mothur 软件生成，序列与已知数据库 GreenGene^[13]，Silva^[14]进行比对分析。计算其距离，并进行 OTU 聚类。微生物种类的划分采用 RDP training set (V9) database 数据库^[15]。选择 50 个丰度最高的 OTUs 用来构建 Heatmap 图。

细菌群落结构相似性分析：根据 OTU 组成和丰度 样品间相似性用 thetacy algorithm 进行计算，构建样品的相似聚类图。进行 PCoA 分析，确定不同样品间相似性和差异性。如果样品点间的距离越近，说明两个样品间相似度越高。

2 结果

2.1 拮抗菌在不同有机肥的定殖效果

3 株拮抗芽孢杆菌在 5 种不同有机肥中的定殖情况如表 1 所示。从表 1 可以看出，甲基营养型芽孢杆菌 JK-3 菌株在 5 种有机肥中定殖效果最好，含菌量和增殖率都明显高于枯草芽孢杆菌 JK-4 和解淀粉芽孢杆菌 JK-10 菌株，说明甲基营养型芽孢杆菌 JK-3 可利用有机肥中的营养物质进行大量繁

表 1 3 株拮抗菌在 5 种有机肥中定殖率

Table 1 Colonization rate of three antagonistic strains in five organic fertilizers

| 拮抗菌 Antagonistic strains | 有机肥 A Organic fertilizer A | 有机肥 B Organic fertilizer B | 有机肥 C Organic fertilizer C | 有机肥 D Organic fertilizer D | 有机肥 E Organic fertilizer E | 发酵液 Fermentation broth |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| JK-10 含菌量/(10 ¹¹ CFU·g ⁻¹) | 32 | 58 | 197 | 163 | 164.0 | 10 |
| JK-10 增殖率/% | 320 | 580 | 1970 | 1630 | 1640.0 | — |
| JK-4 含菌量/(10 ¹¹ CFU·g ⁻¹) | 100 | 61 | 870 | 670 | 85.0 | 92 |
| JK-4 增殖率/% | 108.7 | 66.3 | 945.7 | 728.3 | 92.4 | — |
| JK-3 含菌量/(10 ¹¹ CFU·g ⁻¹) | 2100 | 1600 | 1700 | 2000 | 1600 | 37 |
| JK-3 增殖率/% | 5676 | 4324 | 4595 | 5405 | 4324 | — |

殖,适应性较广。枯草芽孢杆菌 JK-4 在有机肥 C 中的菌含量和增殖率最高,其次为有机肥 D,而有机肥 B 和有机肥 E 的菌含量较低,表明有机肥 B 和有机肥 E 不适合 JK-4 生长。解淀粉芽孢杆菌 JK-10 菌株在 5 种有机肥中也能很好地定殖,在有机肥 C 中菌含量和增殖率最高,其次为有机肥 D 和有机肥 E,而在有机肥 B 和有机肥 A 中的菌含量和增殖率低于前 3 种有机肥。以上结果表明,3 株芽孢杆菌均可在有机肥 C 中大量繁殖和生长,其次为有机肥 D。

生物有机肥保存 4 个月后,检测芽孢杆菌的数量。从图 1 可以看出,生物有机肥 C 和生物有机肥 D 中芽孢杆菌的数量分别为 7×10^{10} CFU/g 和 8×10^{10} CFU/g,较初始菌浓度 (1×10^7 CFU/g) 增加了 7000 和 8000 倍。表明,芽孢杆菌可在生物有机肥中长期定殖和存活。

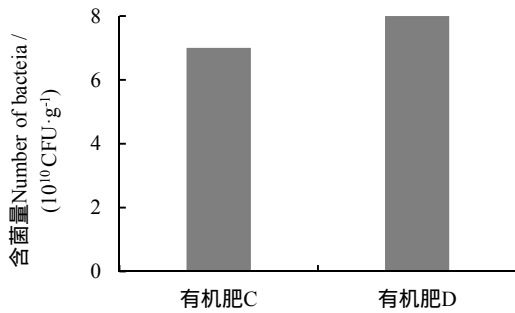


图 1 生物有机肥中芽孢杆菌的数量

Fig. 1 Number of *Bacillus* in bio-organic fertilizers

2.2 生物有机肥对烟草青枯病的防治效果

从图 2 可以看出, SF2、SF4、SF7 3 个处理组的病情指数分别为 5.13、6.84、11.11,均低于对照

组(SF8),对照组病情指数为 18.38,各处理之间差异达到极显著水平 ($p < 0.01$)。SF2、SF4 和 SF7 的防治效果分别为 82.18%、68.82%和 56.99%,各处理之间差异也达到极显著水平 ($p < 0.01$)。表明,施用有机肥和抗青枯生物有机肥对烟草青枯病均有不同程度的防治效果。与有机肥(SF7)相比,添加了芽孢杆菌的生物有机肥的防治效果更好。SF2 因原料组成不同以及芽孢杆菌的定殖率较高,其防治效果最好。

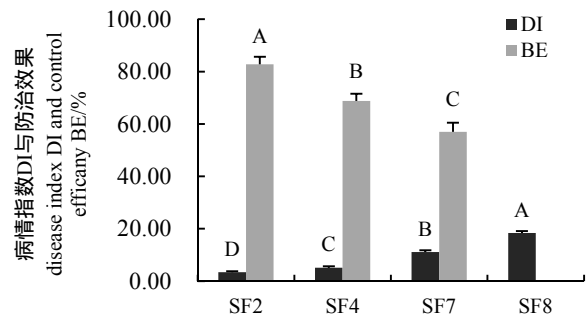


图 2 生物有机肥对烟草青枯病的防治效果

Fig. 2 Control efficiency of bio-organic fertilizers on tobacco bacterial wilt

2.3 生物有机肥对烟株生长的影响

从图 3 可以看出, SF2、SF4、SF7 处理组烟株的茎围均高于对照组(SF8),分别增加了 6.3%、9.6%、5.2%。其中, SF2、SF4、SF7 处理组的烟株茎围显著高于对照组 ($p < 0.05$)。SF4 处理组烟株的株高最高, SF4 和 SF7 处理组烟株的株高显著高于对照组 ($p < 0.05$)。SF2 处理组烟株的株高与对照组无显著差异。表明,施用生物有机肥可显著促进烟株的生长。

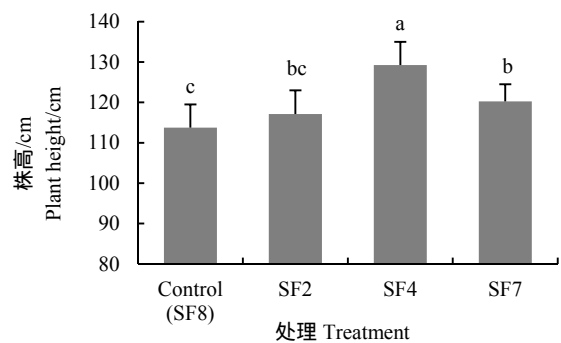
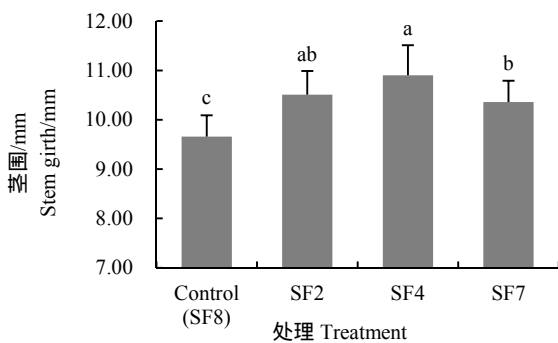


图 3 生物有机肥对烟株生长的影响

Fig. 3 Effects of bio-organic fertilizers on tobacco growth

2.4 不同土样中细菌群落结构分析

从图 4 (A, B) 可以看出, 移栽后 0 和 60 d, SF2 和 SF4 土样细菌种群的组成在 PC1 和 PC2 坐标轴上均表现出明显差异, 在移栽后 120 d, SF2 与 SF4 土样细菌群落结构趋于一致。SF2 和 SF4 土壤的细菌种群在烟草的各个生长时期均与对照组 (SF8) 有明显差异。SF7 与 SF8 土样的细菌种群在移栽后 0 和 60 d 较为相似, 在栽后 120 d, 两者差异明显。从图 4C 可以看出, 移栽后 120 d, SF7 处理组中放线菌门 (*Actinobacteria*) 细菌的相对丰度高于 SF8 对照组 (SF7, 22.11%; SF8, 20.78%), 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的丰度也明显增加 (SF7,

10.14%; SF8, 5.87%)。变形菌门 (*Proteobacteria*) 的相对丰度则明显低于对照组 (SF7, 27.43%; SF8, 34.66%)。表明, 有机肥和添加芽孢杆菌的生物有机肥对土壤细菌种群及丰度均有不同程度的影响。两种生物有机肥的土壤细菌群落结构在烟草生长后期较相似。

2.5 生物有机肥促进土壤中有益菌的增殖

分析土壤中不同细菌种属的数量, 表明土壤中优势细菌包括 (图 5) 鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas* spp.)、链霉菌属 (*Streptomyces* spp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、短根瘤菌属 (*Bradyrhizobium* spp.)、紫色非硫细菌属 (*Rhodoplanes* spp.)、节细菌属

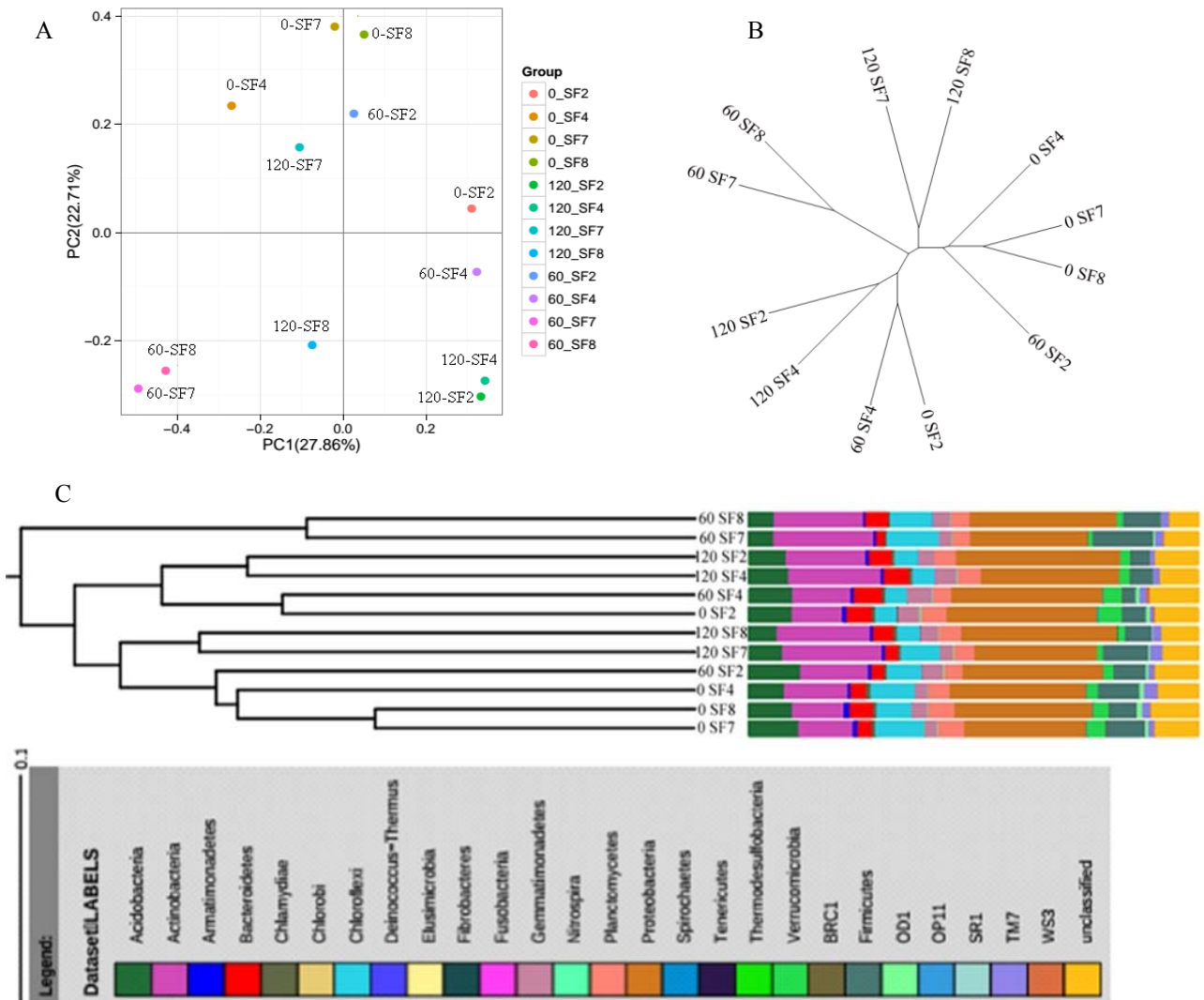


图 4 不同土样细菌群落结构分析

Fig. 4 Analysis of the soil bacterial community in different soil samples

(*Arthrobacter* spp.)。从图 5 看出, SF4 处理的鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* spp.) 丰度最高, 其次为 SF2 和 SF7, 对照组 (SF8) 则最低。SF7 处理组的链霉菌 (*Streptomyces* spp.) 丰度最高, 其次为 SF4, 均高于对照组 (SF8)。SF2, SF4 处理组中芽孢杆菌数量明显高于 SF7 和对照组, 其原因是由于生物有机肥中含有大量芽孢杆菌, 因此使土壤中芽孢杆菌的数量明显增加。此外, SF2、SF4、SF7 处理组中类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* spp.)、耐热芽孢杆菌 (*Thermobacillus* spp.)、梭菌属 (*Clostridium* spp.) 的数量均明显高于 SF8 对照 (图 5)。表明施用生物有机肥促进了土壤中有益菌的生长和繁殖。

2.6 生物有机肥抑制土壤中青枯雷尔氏菌的繁殖

从图 5 看出, 与移栽当天相比, 移栽后 60 d 时, SF2、SF4 和 SF7 处理组土壤中青枯雷尔氏菌的数量明显减少, 且 SF2 和 SF4 减少的幅度更大。然而, 与移栽当天相比, 对照组 (SF8) 土壤中青枯雷尔氏菌的数量在移栽后 60 d 却有所增加。表明使用生物有机肥可抑制病原菌在土壤中的增殖, 从而有效控制烟草青枯病的发生。这也与田间病情指数的调查结果相吻合。

2.7 不同生长时期土壤细菌丰度的变化

从图 6 可以看出, 移栽当天, SF2 土壤中丰度最高的细菌为鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* spp.) 和纤线杆菌属 (*Ktedonobacter* spp.)。移栽后 120 d,

短根瘤菌属 (*Bradyrhizobium* spp.)、分支杆菌属 (*Mycobacterium* spp.) 和球形杆菌属 (*Sphaerobacter* spp.) 的数量明显增加。而地杆菌属 (*Terrabacter* spp.)、产黄杆菌属 (*Rhodanobacter* spp.) 和鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* spp.) 的数量明显减少。

与生长早期相比, 移栽后 120 d, SF4 处理的土壤中鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* spp.)、短根瘤菌属 (*Bradyrhizobium* spp.)、产黄杆菌属 (*Rhodanobacter* spp.) 和分支杆菌属 (*Mycobacterium* spp.) 的数量明显增加。而节杆菌属 (*Arthrobacter* spp.)、海藻球菌属 (*Phycoccus* spp.)、慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium* spp.) 的数量明显减少。表明在烟草生长的不同时期, 各处理组中不同细菌的丰度和数量随着时间的推进发生了明显改变。生物有机肥使用后, 土壤中多种细菌的数量发生了变化。

3 讨论

青枯病是由青枯雷尔氏菌感染植株引起的土传性细菌病害, 青枯雷尔氏菌可侵染多种植物, 如烟草、番茄、马铃薯、辣椒等, 造成了巨大经济损失^[16]。研究表明, 添加有益菌的生物有机肥能有效控制土传病害, 如使用添加了木霉的有机肥后, 土壤中引起黄瓜腐烂的丝核菌的数量明显降低^[17]; 添加短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 和链霉菌

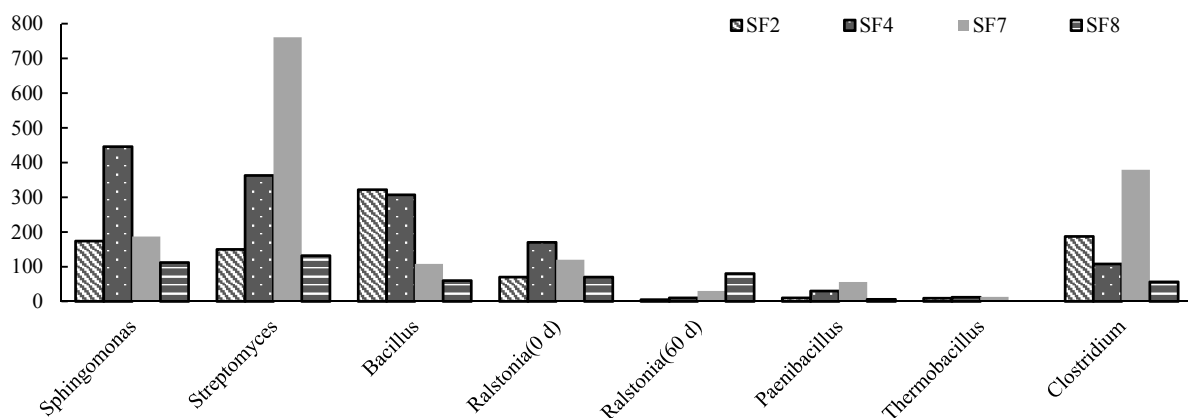


图 5 土壤优势细菌的 OTU 数量

Fig. 5 OTU number of abundant bacteria in soil

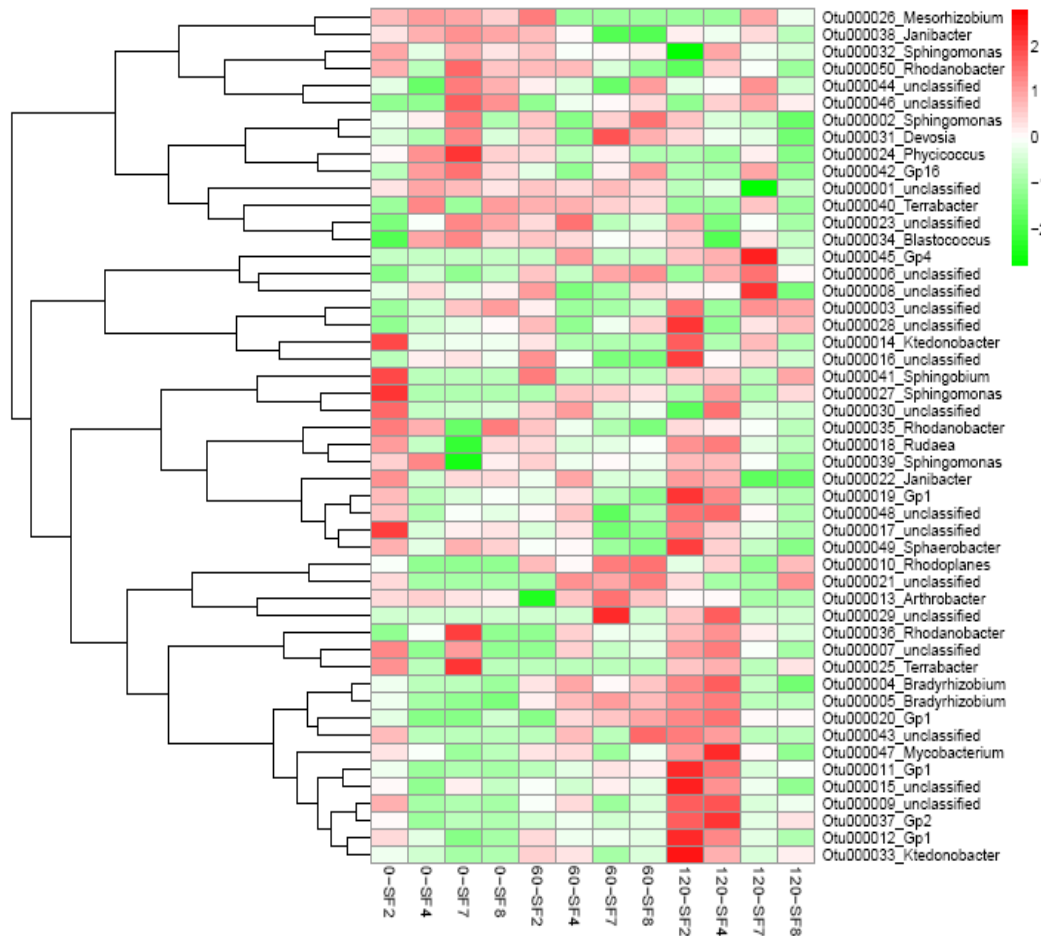


图 6 不同生长时期丰度最高的 50 个 OTU 的数量变化

Fig. 6 Changes of top 50 OTUs during different growth periods

(*Streptomyces rochei*) 的有机肥施于土壤后,有效控制了烟草青枯病^[18]。本研究发现,将 3 株拮抗青枯雷尔氏菌的芽孢杆菌 (JK3, JK4, JK10) 添加至有机肥中,经 2 次发酵制备的生物有机肥,可有效控制烟草青枯病,与仅施用有机肥相比,添加了芽孢杆菌的生物有机肥具有更好的防效,生物有机肥可作为一种控制烟草青枯病的有效措施。

近年来发展起来的宏基因组学 (Metagenomics) 通过从土壤样品中提取微生物基因组 DNA,继而利用高通量测序技术分析土壤微生物种群和组成^[19],可研究不同农业措施对土壤微生物的影响,目前广泛用于研究环境样品及土壤中微生物群落结构。本研究通过高通量测序技术全面分析了添加拮抗菌的有机肥对植烟土壤微生物群落的影响,可更加全面地分析生物有机肥控制青枯病的机制。

据报道,有机肥改变了土壤微生物种群结构,增加了微生物多样性。我们发现,与单施化肥 (SF8) 相比,使用有机肥 (SF7 处理) 后,土壤中鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* spp.)、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* spp.)、耐热芽孢杆菌 (*Thermobacillus* spp.)、梭菌 (*Clostridium* spp.) 的丰度明显增加了。鞘氨醇单胞菌 (如 *S. yanoikuyae*, *S. japonicum*) 能降解芳香族污染物,如多环芳香烃类物质^[20,21]。这些菌可降解土壤中有机污染物和肥料中有机物,从而减少污染物危害,促进烟株的生长。类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* spp.) 耐热芽孢杆菌 (*Thermobacillus* spp.) 和梭菌属 (*Clostridium* spp.) 数量的增加,则有助于降解肥料中的有机物^[22-24]。此外, SF7 处理中链霉菌 (*Streptomyces* spp.) 增加非常明显,链霉菌属可产生多种活性物质如抗生素、杀

虫剂、除草剂、植物生长促进剂^[25]。链霉菌广泛用于植物病害的生物防治中，如 *S. mycarofaciens* SS-2-243、*S. philanthi* RL-1-178 菌株可抑制红辣椒的青枯病^[26]。推测 SF7 处理土壤中链霉菌数量的增加，能抑制青枯雷尔氏菌的生长，从而控制了青枯病的发生。

添加了芽孢杆菌的生物有机肥（SF2 和 SF4 处理）也能增加上述土壤中有益菌的数量，但影响种类和程度存在一定差异。芽孢杆菌（*Bacillus* spp.）属于厚壁菌门（*Firmicutes*）的芽孢杆菌目（*Bacillales*），许多芽孢杆菌能分泌大量的酶和抗生素。枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等能有效控制多种植物病害（如青枯病）^[27-28]。与仅施用有机肥（SF7）相比，添加了芽孢杆菌的生物有机肥（SF2 和 SF4）处理组土壤中芽孢杆菌的数量增加更加明显，且青枯雷尔氏菌的数量也减少的更多，表明通过在有机肥定殖后再施入土壤，芽孢杆菌在土壤中能更好更稳定地生长和定殖，从而更好地抑制青枯雷尔氏菌的生长，达到更高的防效。

参考文献

- [1] JI X, LU G, GAI Y, et al. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2008, 65: 565-573.
- [2] TAN H, CAO L, HE Z, et al. Isolation of endophytic *Actinomyces* from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro[J]. World J Microb Biot. 2006, 22: 1275-1280.
- [3] BAILEY K L, LAZAROVITS G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments[J]. Soil Till Res, 2003, 72: 169-180.
- [4] SCHÖNFELD J, GELSOMINO A, OVERBEEK L S, et al. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 43: 63-74.
- [5] ORTÍZ-CASTRO R, CONTRERAS-CORNEJO H A, MACÍAS-RODRÍGUEZ L, et al. The role of microbial signals in plant growth and development[J]. Plant Signal Behav. 2009, 4: 701-712.
- [6] SCHLOSS P D, HANDELSMAN J. Biotechnological prospects from metagenomics[J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 303-310.
- [7] VOGEL T M, SIMONET P, JANSSON J K, et al. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7: 252.
- [8] TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding[J]. Mol Ecol, 2012, 21: 2045-2050.
- [9] DELMONT T O, PRESTAT E, KEEGAN K P, et al. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome[J]. ISME J, 2012, 6: 1677-1687.
- [10] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN W, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437: 376-380.
- [11] GUO J H, QI H Y, GUO Y H, et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biol Control, 2004, 29: 66-72.
- [12] WOOLEY J C, GODZIK A, FRIEDBERG I. A primer on metagenomics[J]. PLoS Computational Biology, 2010, 6(2): e1000667. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667.
- [13] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Applied and Environment Microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [14] 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: D590-D596.
- [15] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environment Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [16] KONICKA M. Diagnostic protocols for regulated pests [J]. EPPO Bulletin, 2010, 31(1): 37-39.
- [17] TRILLAS M I, CASANOVA E, COTXARRERA L, et al. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings[J]. Biol Control, 2006, 39: 32-38.
- [18] LIU Y X, SHI J X, FENG Y G, et al. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strain in combination with organic fertilizer[J]. Bio Fertil Soils, 2013, 49: 447-464.
- [19] STEFANO M, ANNA B. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology[J]. Research in Microbiology, 2010, 161: 497-505.
- [20] SHI T, FREDRICKSON J K, BALKWILL D L. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 26: 283-289.
- [21] STORY S P, KLINE E L, HUGHES T A, et al. Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2004, 47: 168-176.
- [22] HARTMANN M, FREY B, MAYER J, et al. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming[J]. ISME Journal, 2015, 9(5): 1177-1194.
- [23] RYCKEBOER J R, MERGAERT J, VAES K, et al. A

- survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes[J]. *Annals of Microbiology*, 2003, 53(4): 349-410.
- [24] WATANABE K, NAGAO N, YAMAMOTO S, et al. *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor[J]. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2007, 57(7): 1473-1477.
- [25] WELLINGTON B. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of Actinomycetes[J]. *Bio. Control*, 2003, 48: 233-240.
- [26] SAWAI B, SAMERCHAI C, VASUN P. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper[J]. *Biocontrol*, 2011, 56: 365-374.
- [27] LEMESSA F, ZELLER W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia[J]. *Biological Control*, 2007, 42: 336-344.
- [28] TAN S Y, JIANG Y, SONG S, et al. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth[J]. *Crop Prot*, 2013, 43: 134-140.

《中国烟草学报》2018年第2期目次

- 1 卷烟主流烟气中糖和多元醇在不同粒径气溶胶中的分布研究.....司晓喜, 刘志华, 朱瑞芝, 等
- 8 杏子酸味烟用香料靶向组分的确定及制备工艺优化.....张文娟, 张国臣, 王宏伟, 等
- 18 气相色谱法检测再造烟叶浓缩液浓度.....张玉娟, 袁广翔, 俞京, 等
- 24 茉莉酸甲酯对烟草分泌型和非分泌型腺毛形态发生的影响.....娄亚楠, 王召军, 杨欣玲, 等
- 30 低温胁迫对烤烟幼苗光合荧光特性及叶片结构的影响.....李琦瑶, 陈爱国, 王程栋, 等
- 39 钾对烟草根际氮细菌、氮古菌群落及氮代谢的影响.....翁泽斌, 彭世文, 王淑民, 等
- 48 低钾胁迫对烟草幼苗活性氧及抗氧化酶系统的影响.....况帅, 冯迪, 宋科, 等
- 55 土壤硬度对烤烟生产的影响及原因分析.....戴华鑫, 牟文君, 陈丽燕, 等
- 65 等碳量添加不同有机物料对土壤有机碳组分及土壤呼吸的影响.....王梦雅, 符云鹏, 黄婷婷, 等
- 74 水肥一体化条件下烤烟氮素营养高效利用研究.....席奇亮, 杨铁钊, 周方, 等
- 84 生物炭与化肥氮配施对土壤氮素及烤烟利用的影响.....葛少华, 丁松爽, 杨永锋, 等
- 93 基于恒定市场份额模型(CMS)的中国烟草制品出口影响因素研究.....李瑞滔, 秦怡峰, 李德华, 等
- 100 新型烟草制品市场发展及法律监管研究.....李磊, 周宁波, 屈湘辉
- 111 烟叶产业扶贫的实践与实效.....韩非, 刘建利, 蒋诗栋
- 117 龙岩山区基本烟田土地整理的实践与思考.....施伟平, 林志华, 赖建辉, 等
- 125 鸢尾丝囊霉 (*Aphanomyces iridis*) 引起的烟草漂浮苗根腐病的初步报道.....李小杰, 李淑君, 李成军
- 129 河南烟草镰刀菌的分子鉴定及致病性分析.....邱睿, 白静科, 李成军, 等
- 135 烟草镰刀菌根腐病的病原鉴定.....吴安忠, 程崖芝, 巫升鑫, 等