

花生连作红壤芽孢杆菌的群落多样性及其生防效果研究^①

李 婧, 陈广波, 张 坤, 崔中利, 曹 慧*

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘 要: 芽孢杆菌是土壤中常见的微生物类群, 在土壤生态系统中占据重要地位。本研究发现低丘红壤区花生连作红壤中芽孢杆菌的数量为 $2.0 \times 10^5 \sim 2.3 \times 10^5$ cfu/g 干土。通过构建 3 个样品的基因文库, 共得到 9 个种类; 16S rDNA 测序结果表明该地区芽孢杆菌的优势类型有短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、高地芽孢杆菌, 分别占总克隆的 54%、12% 和 14%。并研究了施用不同微生物制剂对连作花生产量和生育性状的影响, 结果显示, 施用光合细菌和枯草芽孢杆菌能够在一定程度上提高花生的产量, 枯草芽孢杆菌和光合细菌混合施用的增产效果最好, 比对照提高了 32.14%。

关键词: 花生连作; 微生物多样性; 芽孢杆菌; RFLP 分析; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: S565.2

花生是南方低丘红壤区的主要油料作物和经济作物。有研究表明花生连作 2 年, 可导致花生减产 8% ~ 10%; 连作 3 年则减产 25% ~ 30%; 连作 4 年以上可导致减产 50% 以上^[1]。长期以来研究者从不同角度对作物连作的障碍原因进行了分析, 多数学者分析认为连作后的土壤微生物区系变化是引起作物减产的重要原因^[2-6]。大量研究结果表明, 随着花生连作年限的增加, 土壤真菌数量显著增加, 细菌和放线菌数量明显减少^[1-3]。同时还有其他研究结果显示, 土壤微生物多样性亦随着连作年限的增加而降低^[2,4,6]。而芽孢杆菌 (*Bacillus*) 在土壤生态系统中占据着重要地位, 现已证明在农业^[7-12]、工业^[12]、医药^[12]、卫生^[12]、环保^[13]等领域都发挥着重要作用, 尤其是作为生物菌剂在生物防治和促进植物生长方面有着重要的应用价值, 目前已有许多关于芽孢杆菌作为生物菌剂的研究^[14-16]。本试验采用基于 16S rDNA 的 PCR-RFLP 方法, 对花生连作红壤中可培养的芽孢杆菌群落结构和多样性进

行了研究, 分析了花生连作对红壤芽孢杆菌菌群的影响趋势, 并将分离的芽孢杆菌作为生物防治菌剂施用于供试土壤, 探究了微生态制剂对当地连作花生的产量及品质影响, 为推广生物防治菌剂以解除当地花生连作危害提供了研究参考。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

研究区域位于江西省鹰潭市余江县刘家站, 该地区为中亚热带温暖湿润的季风气候, 年均温 17.8℃, 年均降雨量 1 785 mm, 主要集中在 4—6 月。采集连续 2 年种植花生的土壤, 共 3 个小区, 每个小区面积为 1.1 hm² (90 m × 120 m)。按照五点采样法采集相邻 5 个地点的土壤样品, 采样深度为 0 ~ 15 cm, 混合、封装带回, 重复 3 次。除去石块和植物根系等杂物, 4℃ 冰箱中保存。土壤理化性质见表 1 (试验结果由中国科学院南京土壤研究所提供)。

表 1 3 个土壤样品的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the three tested soils

采集地	pH	有机质 (g/kg)	全 N (g/kg)	碱解 N (mg/kg)	速效 P (mg/kg)
PCC 1	4.76	13.98	0.69	2.57	14.04
PCC 2	4.91	13.43	0.72	2.78	14.65
PCC 3	4.76	13.53	0.61	2.48	14.56

注: PCC 表示花生连作土壤 (peanut continuous cropping soil)。

①基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2009BAD6B003) 资助。

* 通讯作者: (hcao@njau.edu.cn)

作者简介: 李婧 (1984—), 女, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: xiaowujiu402@163.com

1.2 试验试剂

限制性内切酶 *Hha* I 和 *Xsp* I 购于大连宝生物工程有限公司, 丙酰胺、过硫酸胺、四甲基己二胺均购自上海生工生物公司, Taq 酶等 PCR 试剂购自上海申能博彩公司, 16S 通用引物由上海英骏生物公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 芽孢杆菌的计数、分离 平板稀释涂布计数, 高温加热分离芽孢杆菌见参考文献[17,18]。

1.3.2 菌落 PCR 扩增 16S rDNA 16S rDNA 的扩增体系和方法见参考文献[19], 通用引物参考文献[20-21]。所得 PCR 产物通过 0.75% 的琼脂糖电泳, EB染色后紫外分析仪检测。

1.3.3 限制性酶切 PCR 产物 限制性内切酶 *Hha* I 和 *Xsp* I 都是四碱基的酶, 酶切位点丰富, 可直接应用于对某些细菌的种间分类分析[22]。酶切体系为: 10×酶切缓冲液 1 μ l, PCR产物 2 μ l, *Hha* I 酶或 *Xsp* I 酶 0.5 μ l, 无菌双蒸水补至 10 μ l, 37°C 水浴过夜。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳 酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分开, 室温条件下, 恒流 30 mA, 约 3 h 分离。再剥胶银染 (包括染色、显色两个步骤), 最后扫描仪扫描、保存图片。每 100 ml 8% 的 PAGE 胶中各物质含量分别为: 52.7 ml 的水, 20.0 ml 的 5×TBE, 0.7 ml 的 10% APs, 60 μ l 的 TEMED, 26.6 ml 的 30% 丙烯酰胺。

1.3.5 RFLP 分析及多样性指数计算 以基因片段多态图谱为基础进行聚类, 根据不同图像间的相似性将所有的图谱聚合成一个聚类树。通过聚类分析而被聚合到一起的具有相同基因图谱的基因, 被认为是同一基因型。每一个基因型称为一个操作分类单位 (operational taxonomic units, OTUs) 或称为唯一基因型[23]。

多样性指数计算的方法参考文献[24]进行, 16S rDNA 克隆文库的库容 (Coverage C) 值的计算公式参见文献[25]。

1.3.6 测序及系统发育树的构建 3 个土壤样品的优势菌群由上海英骏生物公司完成测序工作, 测出的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 网站中比对同源性并提交 GenBank 数据库, 登录号为: JF495459 ~ JF495465。根据 NCBI 同源性比对的结果, 从核酸数据库中下载同源性高的 16S rDNA 序列以及不同分类来源的代表性 16S rDNA 序列, 用 BioEdit 将序列转换为 FASTA 格式。以上 FASTA 格式文件用 ClustalX 进行多序列比对后, 用 MEGA 进行分析比

对, 最后通过邻接法 (neighbor-joining) 生成系统进化树。

1.4 生物防治试验

随机选择其中一个连作小区 PCC 2 进行生防试验。枯草芽孢杆菌是目前研究报道较多的一类芽孢杆菌, 广泛存在于土壤、湖泊、海洋和动植物的体表, 由于其无致病性, 并可以分泌多种酶和抗生素, 而且还具有良好的发酵基础, 所以用途十分广泛[26]。而施用光合细菌作为微生物菌肥可以增加生物固氮作用, 提高作物根际固氮效应, 增进土壤肥力[27]。

微生物制剂施肥方案为: 处理 1 为芽孢杆菌; 处理 2 为光合细菌; 处理 3 为芽孢杆菌+光合细菌; 处理 4 为灭菌后的制剂 (LB 液态培养基)。所有处理小区预先施入尿素 0.75 kg, 钙镁磷肥 1.46 kg, 有机肥 5.4 kg 作为基肥。微生物制剂为液体菌剂, 菌剂总密度为 10^{10} cell/ml, 分别于苗期和花期喷施花生, 每次施用量 75 L/hm²。其中枯草芽孢杆菌分离来自于原连作花生土壤; 光合细菌是购买的菌剂粉末 (江苏绿科生物技术有限公司)。

花生供试品种为江西省鹰潭市常规品种赣花 5 号。

微生物制剂小区设计: 试验小区共设置 16 个, 分别为 4 个处理 4 个重复, 随机排列。每个小区面积 35 m² (5 m × 7 m), 并设置保护行, 小区与小区之间分割沟的宽度为 40 ~ 50 cm。

九月初花生收获后分别测定其产量、株高、根长、饱果率、百果重, 每个处理 4 个重复均要测量。整理并处理相关数据。

2 结果

2.1 平板计数结果

从图 1 可以看出, 该地区连作土壤中的芽孢杆菌数量为 $2.0 \times 10^5 \sim 2.3 \times 10^5$ cfu/g 干土, 平均值为 2.1×10^5 cfu/g 干土。

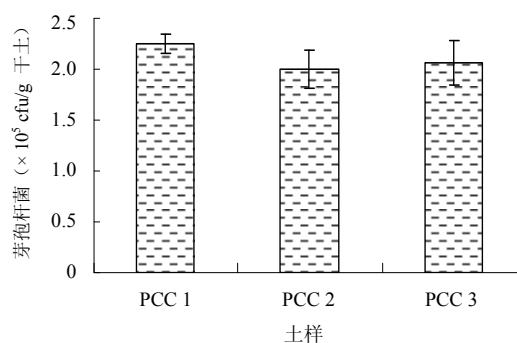
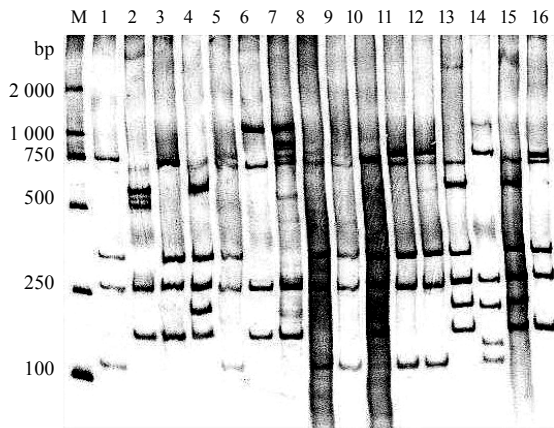


图 1 3 个土样的芽孢杆菌菌群数量

Fig. 1 Numbers of *Bacillus* in the six tested soils

2.2 土壤芽孢杆菌 16S rDNA 的扩增及 PCR-RFLP 分析

直接以菌体为模板扩增的 16S rDNA 基因片段约为 1 500 bp, PCR 产物经限制性内切酶 *Hha* I 及 *Xsp* I 酶切, 酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后得到的图谱如图 2。



(1~16: *Xsp* I digestion of 16S rDNA; M: DL2000 DNA marker)

图 2 16S rDNA 的部分 *Xsp* I 酶切图谱

Fig. 2 *Xsp* I digestion of 16S rDNA

2.3 芽孢杆菌的酶切类型分析

从 3 种土壤样品中共随机挑选了 147 株单菌落,

采用 *Hha* I 和 *Xsp* I 联合酶切, 经过归类, 共得到了 9 个 OTUs, 分别以大写的英文字母命名 (A~J)。每个文库的类型和所占比例如图 3 所示。

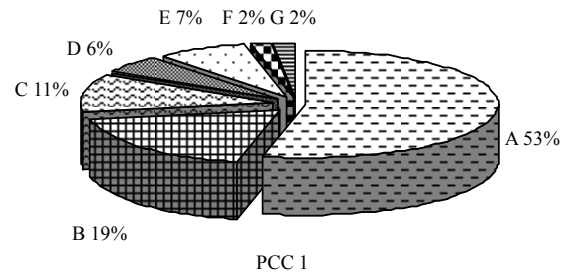


图 3 3 个基因文库 RFLP 类型与比例

Fig. 3 Frequencies of sacculus phylogenetic lineages detected in three gene clone libraries from all samples

从图 3 明显可以看出: A 为 3 种样品均有相同的优势 OTUs, 在 3 个连作土样的比例都占到 50% 左右, 类型 B、C 也是所有土样中的数量较大的菌群, 即为所有土样中的优势或次优势菌群。D、E 两种类型未能从 PCC 2 土样中检测到, 类型 H 没有从 PCC 1 土样中检测到, F 和 G 只出现了某一种土样中, 为单一克隆。

表 2 3 个土壤样品芽孢杆菌基因文库的群落多样性结构指数

Table 2 Diversity indices of bacillus gene libraries from three soil samples

土壤样品	OUT 数目	库容 (%)	Shannon-Wiener 指数	Margalef 指数	Simpson 指数	均匀度
PCC 1	54	96.30	1.40	1.50	0.66	0.72
PCC 2	47	100	1.22	1.04	0.62	0.93
PCC 3	46	97.83	1.34	1.31	0.65	0.75

从表 2 可以看出: 3 个文库的库容值都较高, 均超过 95%, 表明所建立的基因文库能够比较完整地反映土壤芽孢杆菌群落结构。各类多样性指数数值显示 3 个土壤样品的多样性相似度较高。总体而言, 供试连作土壤样品的多样性指数为 PCC1>PCC3>PCC2。

从均匀度指数和丰富度指数来看, 文库的均匀程度都较高, 其中样品 2 的均匀度最高。说明 3 个土壤样品中的芽孢杆菌群落很好地适应了当地的土壤环境, 没有受到其他条件的作用使其发生单一化。

2.4 序列测定与系统发育树构建

选择 7 种 OTUs 进行测序, 这 7 种 OTUs 的数量与其来源培养平板的酶切菌落数量比例 >5% 以上,

被定义为优势菌群。7 种 OTUs 所代表的菌经 16S rDNA 扩增、纯化、转化后的克隆被送上海英骏生物公司完成测序。

测序结果提交 NCBI 数据库, 获得相应的登录号, 分别是 JF495459~JF495465, 利用 Mega 4.0 生物软件构建系统发育树 (图 4)。

从图 4 可以看出, 这些优势菌群分别是短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、高地芽孢杆菌 (*B. altitudinis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)、腊质芽孢杆菌 (*B. cereus*) 及类芽孢杆菌 (*Paenibacillus sp.*)。其中短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、高地芽孢杆菌在 3 种土样的检出率均很高, 短小芽孢杆菌是所有

土样的主要类型，均占 50% 以上，且数量相差不大。PCC 2 的枯草芽孢杆菌检出率明显低于其他 2 种土样，而高地芽孢杆菌的数量是其他 2 种土样的两倍，这两类芽孢杆菌也是所有土壤样品的重要类型。解淀粉芽

孢杆菌和苏云金芽孢杆菌未从 PCC 2 中检出；腊质芽孢杆菌存在于 PCC 2 和 PCC 3 中，数量很少；类芽孢杆菌属的这类菌在 PCC 2 土样中占 10%，但其他两个土样并未检测到。

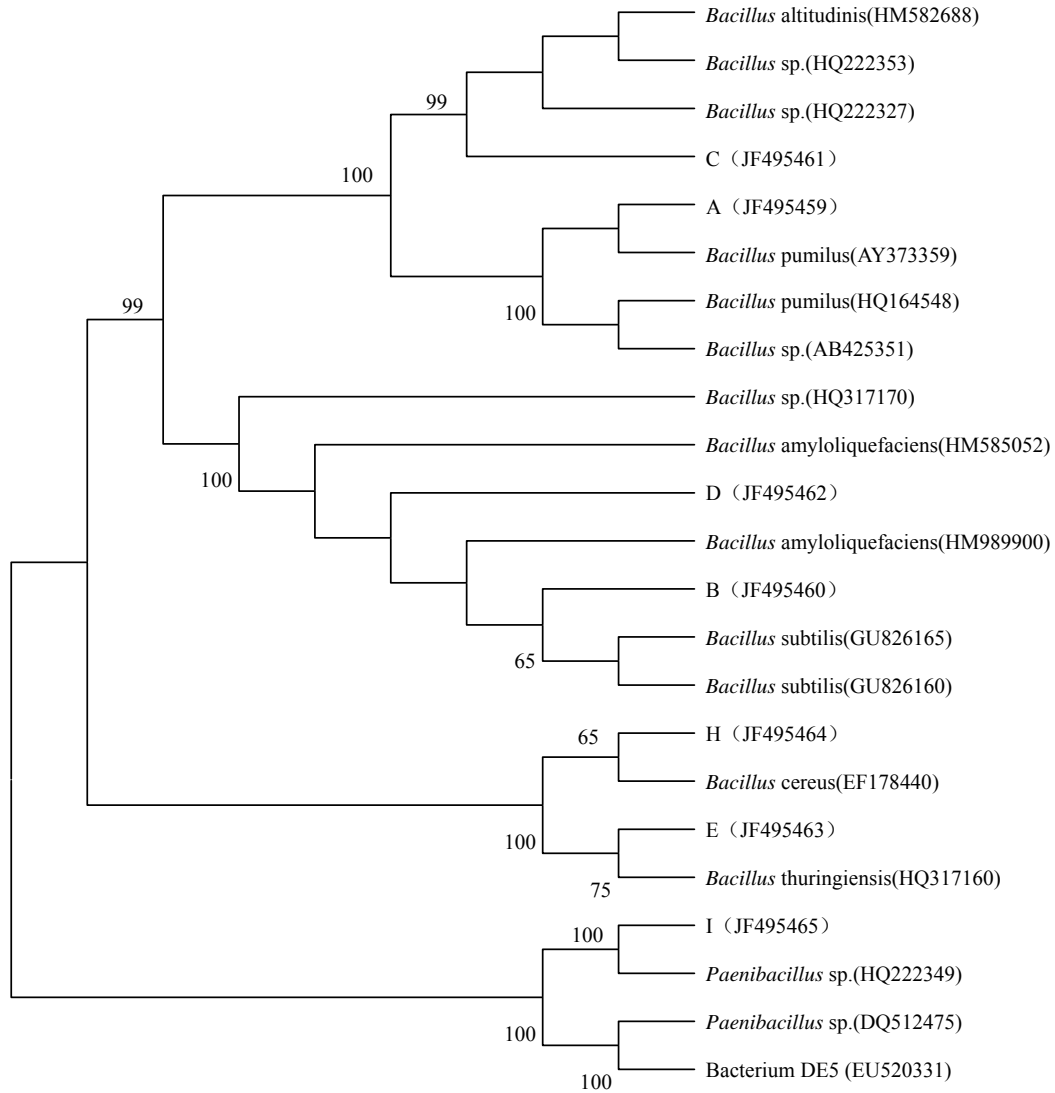


图 4 基于 16S rDNA 序列的土壤微生物系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequencing of soil microbe

2.5 不同生态制剂处理对连作花生产量及生育性状的影响结果

表 3 的结果显示，施用光合细菌和枯草芽孢杆菌能够在一定程度上提高花生的产量，与对照（处理 4）相比，分别提高了 18.58%、10.34%、32.14%，增长效果是两种菌剂混施>施用芽孢杆菌>施用光合细菌，但各处理间差异不显著。施用微生物菌剂对株高也有一定的促进作用，分别依顺序比对照高出 0.57 cm、1.86 cm、0.17 cm。光合细菌和芽孢杆菌混施还对花生的饱

果率有一定的提高作用，比对照提高了 3.1%。

3 讨论

本研究对鹰潭地区花生连作红壤的芽孢杆菌种群与多样性进行了研究，结果发现连作土壤的芽孢杆菌数量较丰富^[28]，范围在 $2.0 \times 10^5 \sim 2.3 \times 10^5$ cfu/g 干土，平均值为 2.1×10^5 cfu/g 干土。总数量与 Garbeva 等^[29]报道的相近，但比唐志燕等^[28]报道的研究低。龚国淑^[18]采用“直接法-麦芽汁”分离芽孢杆菌得到 21 个

表 3 不同微生物制剂对连作花生产量与生育性状品质的影响

Table 3 Effects of different microorganisms on growth of continuous cropping peanut

处理	产量 (kg/hm ²)	百果重 (g)	饱果率 (%)	株高 (cm)	根长 (cm)
处理 1	191.53 ± 3.90	101.25 ± 15.48	56.77 ± 9.34	10.44 ± 1.81	36.23 ± 5.90
处理 2	178.23 ± 2.62	101.25 ± 36.37	47.96 ± 8.66	11.73 ± 2.60	37.80 ± 2.11
处理 3	213.47 ± 5.98	101.25 ± 33.01	58.73 ± 2.92	10.04 ± 1.26	35.00 ± 3.08
处理 4	161.55 ± 3.87	110.00 ± 29.72	56.97 ± 9.98	9.87 ± 0.99	36.90 ± 4.63

种, 本研究的分型结果显示 3 种土样的总体种类并不多, 147 株单菌株归属于 9 个种, 且有 3 个 OUTs 只出现在某一种土壤样品中。目前还未发现一种能真正测定土壤中芽孢杆菌的实际数量和类群的有效方法, 分子生物学方法结合常规分离法虽然简便快捷, 但获得芽孢杆菌种群数量有限, 不利于全面反映该地区的实际情况, 不过可以反映芽孢杆菌在微生物群体中的相对比例。

张华勇等^[30]分析了不同生态下红壤中的芽孢杆菌, 发现巨大芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌在林地、旱地、水田中比较常见, 没有报道其数量状况。但不同土壤类型、水热条件下的微生物种群差异较大。而刘国红^[31]在调查我国 15 个省 15 份土样中芽孢杆菌情况时发现, 江西鹰潭贵溪的林地中优势种群为蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌, 常见种群为简单芽孢杆菌、短小芽孢杆菌。本研究的数据表明实验地域连作花生土壤中的 3 种主要的优势芽孢杆菌类型为短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和高地芽孢杆菌, 常见类型为蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和假单胞菌芽孢杆菌, 一定程度上印证和补充了张华勇等^[30]和刘国红^[31]的研究结论。

采用微生物制剂解除作物连作障碍的研究是当前的研究热点之一, 有研究表明枯草芽孢杆菌在芽孢形成初期分泌各种抗菌物质, 对病原真菌有特异性的防治作用, 从而能有效地防治植物病虫害; 同时用芽孢杆菌制成的生物菌剂克服了传统化学农药污染环境、危害人畜、易产生抗性等优点, 具有选择性强、安全、原料简单等优点^[32]。早在 1879 年, 拜耳前身公司生产的一种菌肥, 使用的就是枯草芽孢杆菌^[33]。光合细菌由于其自身富含的多种营养物质和生物活性物质, 以及可以进行光合作用、有氧呼吸、发酵及固氮、固碳、防氢等生理功能^[34-36]。本研究中选取土壤中分离的枯草芽孢杆菌和光合细菌联用作为生物防治菌剂, 发现施用枯草芽孢杆菌菌剂能一定程度增加作物的产量, 与光合细菌联合施用的增产效果最好, 表明该枯草芽孢杆菌作为微生物调节剂用于克服作物生产中的重茬

连作具有较好的效果。芽孢杆菌作为环保型的生物抗重茬剂, 未来有望成为减轻或解除花生连作障碍的一项经济有效的对策, 但仍需要长期试验验证效果。目前我们对芽孢杆菌的生防机制尚不明了, 需要进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 孔祥云, 周晓冬, 吴洪生, 闫霜, 刘小雪, 王增辉. 花生连作障碍防治研究进展. 江西农业学报, 2010, 22(8):12-15
- [2] 封海胜, 张思苏, 万书波, 隋清卫, 左学青. 花生连作对土壤及根际微生物区系的影响. 山东农业科学, 1993(1): 13-15
- [3] 孙秀山, 徐瑞富, 王小龙. 花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究. 花生学报, 2003, 32(3): 19-24
- [4] 胡元森, 吴坤, 李翠香, 贾新成. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II: 基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2 267-2 273
- [5] 王兴祥, 张桃林, 戴传超. 连作花生土壤障碍原因及消除技术研究进展. 土壤, 2010, 42(4): 505-512
- [6] 张重义, 陈慧, 杨艳会, 陈婷, 林瑞余, 陈新建, 林文雄. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2 843-2 848
- [7] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103
- [8] 范青, 田世平, 李永兴, 汪沂, 徐勇, 李久蒂. 枯草芽孢杆菌 B-912 对采后柑桔果实青、绿霉病的抑制效果. 植物病理学报, 2000, 30(1): 343-348
- [9] 黎起秦, 林纬, 陈永宁, 彭好文, 蒙姣荣, 韦绍兴. 芽孢杆菌对水稻纹枯病的防治效果. 中国生物防治, 2000, 16(4): 160-167
- [10] 林启美, 饶正华, 孙焱鑫, 张有山, 姚军, 刑礼军. 一株胶质芽孢杆菌 RBC13 的解磷解钾作用. 华北农学报, 2000, 15(4): 116-119
- [11] 于翠, 吕德国, 秦嗣军, 杜国栋. 本溪山樱根际与非根际解磷细菌群落结构及动态变化. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2 381-2 384
- [12] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用. 土壤, 2001, 33(2): 92-96
- [13] 杨妹倩, 李素玉, 李法云, 谯兴国, 罗岩, 张志琼. 沈抚污灌区

- 结冻土壤中微生物群落及石油烃优势降解菌的筛选. 气象与环境学报, 2006, 22(3): 54-56
- [14] 易有金, 罗坤, 罗宽, 刘二明. 内生枯草芽孢杆菌 B-001 菌株内生定殖研究及生物学特性. 核农学报, 2007, 21(4): 349-352
- [15] Rajendran G, Sing F, Desai AJ, Archana G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4 544-4 550
- [16] 洪永聪, 范晓静, 来玉宾, 胡方平. 枯草芽孢菌株 TL2 在茶树体内的内生定殖. 茶叶科学, 2006, 26(4): 270-274
- [17] Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HRP, Clark WA. *International Code of Nomenclature of Bacteria*. Washington: American Society for Microbiology, 1975: 297-313
- [18] 龚国淑, 张世熔, 唐志燕, 杨成伟, 徐严, 张洪. 土壤芽孢杆菌分离方法的比较—以成都郊区土壤为例. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3 685-3 690
- [19] 王萍, 崔中利, 刘标, 孙波, 曹慧. 培养方法对土壤可培养细菌多样性的影响. 土壤学报, 2009, 46(6): 1 096-1 101
- [20] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264
- [21] Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(19): 7 843-7 854
- [22] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(2): 795-799
- [23] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 王英, 孙波, 郝红涛, 李顺鹏. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析. 生物多样性, 2006, 14(4): 345-351
- [24] 夏北成, Zhou J, Tiedje JM. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征. 生态学报, 2001, 21(4): 574-578
- [25] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43: 1-11
- [26] 李明, 双宝, 李海涛, 王晴, 高继国. 枯草芽孢杆菌的研究与应用. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 111-114
- [27] 郑卓辉, 梁文健, 彭增明, 曹裕汉. 光合细菌在农业上的应用. 广东农业科学, 2007(3): 102-103
- [28] 龚国淑, 唐志燕, 邓香洁, 张世熔, 杨继芝. 成都郊区土壤芽孢杆菌的空间分布及其多样性. 生态学杂志, 2009, 28(10): 2 009-2 013
- [29] Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecol.*, 2003, 45: 302-316
- [30] 张华勇, 李振高, 王俊华, 潘映华. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性. 土壤, 2003, 35(1): 45-47
- [31] 刘国红. 芽孢杆菌的分类鉴定及其相关属的分类系统演变研究(硕士学位论文). 福州: 福建农林大学, 2009: 33
- [32] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109-112
- [33] Steiner KU, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, Hain R. FZB24® *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2000, 1: 72-93
- [34] 吴小平, 吕川冰, 陈锋. 光合细菌在种植上的应用研究. 江西农业大学学报, 2004, 26(2): 278-281
- [35] 郑卓辉, 梁文健, 彭增明, 曹裕汉. 光合细菌在农业上的应用. 广东农业科学, 2007(3): 102-103
- [36] 陈克, 杜国营, 冯冰冰, 姚占芳. 光合细菌在蔬菜栽培及废水处理中的应用. 农业与技术, 2005, 25(6): 106-110

Research on Diversity of *Bacillus* Species in Peanut Continuous Cropping Red Soils and Bio-preparation Effect of *Bacillus*

LI Jing, CHEN Guang-bo, ZHANG Kun, CUI Zhong-li, CAO Hui

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Bacillus* spp. are the common microorganisms in soils, occupying an important position in soil ecosystem. Our study found that the total number of culturable *Bacillus* spp. was 2.0×10^5 – 2.3×10^5 cfu/g dry soil in peanut continuous cropping red soils. 9 OUTs restriction endonuclease types were obtained in the three gene libraries. *B. pumilus*, *B. subtilis* and *B. altitudinis*, as the three main restriction types, accounted for 54%, 12% and 14% respectively of the total 16S rDNA clones. The application of *photosynthetic bacteria* and *bacillus subtilis* could increase peanut yield, particularly when they mixed which could increased the yield by 32.14% compared to the control.

Key words: Peanut continuous cropping, Microbial diversity, *Bacillus* spp., RFLP analysis, *Bacillus subtilis*