

青枯病生防菌 N5 的特性及其生物学效应^①

王洪梅, 吴云成, 沈 标*

(南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 从土壤中分离筛选出一株对番茄青枯病原菌有较强抑菌效果的菌株 N5, 经生理生化及 16S rRNA 基因序列分析, 将菌株 N5 初步鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。菌株 N5 具有产生铁载体、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶以及多种脂肽类抗菌物质的能力。菌体发酵后与有机肥(猪粪: 氨基酸肥料 = 1: 1)混合后进行二次发酵制成生物有机肥, 并用盆栽试验验证其生防和促生效果。结果表明: 利用菌株 N5 制备的生物有机肥可以促进番茄的生长, 提高根系的活力。生物有机肥可有效防治番茄青枯病, 其中营养钵使用生物有机肥的处理其生防效果优于大盆使用生物有机肥的处理, 特别是营养钵和大盆均使用生物有机肥的处理其生防效果达 69%, 而使用有机肥并不能有效防治番茄青枯病。使用生物有机肥显著增加根际土壤中细菌、放线菌的数量, 减少真菌和青枯劳尔氏菌的数量。

关键词: 生防菌的分离; 生物学特性; 番茄青枯病; 甲基营养型芽孢杆菌; 生物有机肥; 生物防治

中图分类号: S144.2; Q939.96

青枯病是由一种由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的毁灭性土传病害, 广泛分布于世界上的热带、亚热带及温带部分地区, 在我国江南、华南地区严重发生, 造成了巨大的经济损失^[1-2], 尤其在栽培面积巨大的茄科作物如茄子、番茄和烟草等作物上危害严重。该病害是我国番茄生产上的最重要病害之一, 主要是采用培育抗病品种、喷洒农药和实行轮作等农业措施来防治青枯病, 但这些传统方法受到各种条件的限制, 防治效果很不理想^[3]。采用植物根际生防细菌防治番茄青枯病是目前的研究热点和发展方向^[4]。张彦等^[5]利用蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A, Lian 等^[6]利用枯草芽孢杆菌防治番茄青枯病; Schönfeld 等^[7]利用堆肥修复青枯菌病发病土壤, 并通过 DGGE 验证施肥后土壤中青枯菌数量显著减少; 隋学超等^[8]研究表明, 在基质中添加有机缓释肥能够抑制番茄青枯病; 李胜华等^[9]利用不同的有机肥配施来研究对番茄青枯病的防治效果及其对微生物群落结构的影响。

由于拮抗菌在土壤环境中的定殖效果不稳定, 而且单施有机肥的防病效果也不理想, 所以有必要开发一种促生与生防效果都具备的生防途径。微生物有机肥是将有特定的拮抗菌与腐熟的堆肥和一定比例的

活性有机物料共同发酵制成的, 具有促生和生防的双重效果, 是近年来研究土传病生防治的有效途径^[10-11]。本研究筛选到一株对番茄青枯病有较好拮抗作用的拮抗菌, 经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 利用该种菌防治番茄青枯病的研究国内还没有报道。本研究将该株拮抗菌发酵制成微生物有机肥, 通过盆栽试验验证其防病、促生效果及对土壤微生物区系的影响, 初步探索其促生及生防机理, 为推广利用微生物有机肥防治番茄青枯病奠定基础。

1 试验材料与方法

1.1 材料

本试验所用番茄品种为江蔬 14 号。

盆栽土为健康水稻土, 取自宜兴市张褚镇。土壤的基本理化性质为: 有机质 13.09 g/kg, 速效钾 93.73 mg/kg, 速效磷 53.78 mg/kg, 碱解氮 103.46 mg/kg, pH 6.47。

生防菌为甲基营养型芽孢杆菌 N5(*Bacillus methylotrophicus* N5), 分离自江西省鹰潭市土样。番茄青枯病致病菌茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)及各种病原菌由本实验室提供。

基金项目: 农业部 973 项目(2011CB100500)和农业部公益性行业科技专项(201103004)资助。

* 通讯作者(shenbiao@njau.edu.cn)

作者简介: 王洪梅(1989—), 女, 贵州安顺人, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物与生物(有机)肥料。E-mail: wanghongmei0913@163.com

供试有机肥料由氨基酸肥料和猪粪堆肥按 1:1 的比例混合而成,称为普通有机肥。氨基酸肥料是以菜粕为原料经筛选的高效分泌蛋白酶的微生物分解而制成的氨基酸有机肥料,含有机质 442 g/kg、氨基酸 80 g/kg、N 44 g/kg、 P_2O_5 23 g/kg、 K_2O 6.7 g/kg、水分 285 g/kg;猪粪堆肥含有机质 304 g/kg、N 20.1 g/kg、 P_2O_5 30.7 g/kg、 K_2O 11 g/kg、水分 285 g/kg。2 种有机肥均由江苏新天地肥料公司提供。化肥为尿素(N 460 g/kg),过磷酸钙(P_2O_5 120 g/kg),氯化钾(K_2O 600 g/kg)。

生物有机肥的制备:拈抗菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基(NA)培养基,30℃ 170 r/min 振荡培养 24 h,离心收集菌体并用无菌水重悬。按照 20%(v/w)的比例将拈抗菌菌悬液接种至由猪粪堆肥和氨基酸(1:1)组成的有机肥中混合均匀,置温室下发酵 4 天,即为生物有机肥 BIO,稀释涂布计得其中拈抗菌含量为 5.4×10^9 /g。以同样条件不加拈抗菌发酵有机肥,即为 OF 为对照进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 拈抗菌的分离筛选 从江西鹰潭采集土样,4℃ 保存。将土壤进行稀释后涂布于 NA 培养基平板上,置于 30℃ 恒温箱培养 48 h 后,挑取培养特征相异的单个菌落。利用平板对峙法,每平板点接 3 株不同的菌株,3 次重复,30℃ 培养 24 h 后喷入病原菌菌悬液(10^8 /ml)约 100 μ l,继续培养 12~24 h 观察抑菌效果,挑选出有抑菌效果的菌株并保存。纯化的拈抗菌接种至 5 ml NA 培养基中,30℃、170 r/min 摇床培养 12 h,然后再按 1% 接种量接至 100 ml NA 培养基中,培养 60 h,取培养液用牛津杯法复筛,选取抑菌效果最好的菌株作为供试菌株,菌种用含 20% 甘油的 LB 培养基 -70℃ 保存。

1.2.2 拈抗菌株的生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析 生理生化特性测定包括接触酶、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、糖醇类发酵、明胶液化、淀粉水解、V-P 实验、MR 实验等,参照文献[12-13]进行。

细菌基因组 DNA 的提取参照文献[14],16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增引物(F 5'-AGAGTTTGTACCTG-GCTCAG-3', R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')由金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应体系:0.1 μ l Taq DNA 聚合酶,2.5 μ l 10 $\times$ PCR 反应缓冲液,1.5 μ l $MgCl_2$,2 μ l dNTP,上、下游引物各 1 μ l,1 μ l 模板 DNA,ddH₂O 补足 25 μ l。反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 终延伸 10 min。PCR 产物经纯化后交金斯瑞生物科技有限公

司进行测序,测序结果在 RDP 中进行同源性比较,采用 MEGA 软件进行系统发育分析。

1.2.3 拈抗菌生防促生相关机理的研究 部分脂肽类抗生素合成基因片段的扩增及鉴定:基因组 DNA 的提取参照文献[15],部分脂肽类抗生素合成基因(*srfAB*, *ituD*, *ituB*, *ituA*, *fenB*, *qk*, *fenD*, *ituC* 和 *yndJ*)的扩增的按 Cao 等[16]所描述的方法。引物由南京金斯瑞生物公司合成。PCR 反应条件:25 μ l 反应体系 1 μ l 模板 DNA,2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液,20 mmol/L $MgCl_2$,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L,上下游引物各 0.5 μ mol/L,1.25 U TaqDNA 聚合酶(Takara, Dalian)。扩增 *srfAB*, *ituD*, *ituB*, *ituA*, *fenB* 和 *qk* 基因的反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;扩增 *fenD*, *ituC* 和 *yndJ* 的反应条件为:94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 1 min。

铁载体、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶活性检测:羧甲基纤维素(CMC)培养基(CMC-Na 5.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, K_2HPO_4 0.25 g, 琼脂 20 g, H_2O 1 000 ml, pH 7.0);酪蛋白培养基(葡萄糖 10 g, 酵母粉 4 g, 酪蛋白 10 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0);CAS 培养基参照文献[17]; β -1,3-葡聚糖培养基(葡聚糖 5 g, $NaNO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g, 刚果红 0.05 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0)。将菌株 N5 分别接种在纤维素培养基、 β -1,3-葡聚糖培养基和酪蛋白培养基平板上,30℃ 培养箱倒置培养。观察 N5 菌株在以上 3 种培养基上的生长情况,根据产生水解圈情况分析 N5 菌株产 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶的能力。其中将活化好的菌株 N5 点于 CAS 平板上,根据其是否能在 CAS 检测平板变色,观察菌株 N5 能否产生嗜铁素。

脂肽类物质的提取及抗菌活性的检测:将菌株 N5 接种于发酵培养基 Landy 中,30℃ 170 r/min 摇床培养 72 h,1 000 r/min 条件下培养 30 h。培养结束后,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体细胞,上清液加入 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0,4℃ 过夜。离心收集沉淀,加入甲醇后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,再用甲醇抽提 2 次,获得脂肽类化合物粗提物。采用牛津杯法检测脂肽粗提物抑菌效果,取 200 μ l 10^8 /ml 的病原菌菌悬液涂布 NA 平板,每平板放 3 个牛津杯,每杯加入脂肽粗提物 100 μ l,30℃ 培养 24 h,观察抑菌效果。

抗菌蛋白的提取及抗菌活性的检测:抗菌蛋白的提取采用盐析法[18]。将菌株 N5 培养液离心,取上清

液,从中加固体硫酸铵分别至饱和度分级沉淀,置 4℃下过夜。高速冷冻离心机在 10 000 r/min 4℃下离心 20 min。每 50 ml 培养液所得沉淀用 2 ml 浓度为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液悬浮。琼脂孔扩散对峙法测定抑菌活性,观察抑菌圈直径大小,比较不同饱和度盐沉淀的蛋白的抑菌活性。蛋白含量测定采用 Bradford 法^[19],BSA 作为标准蛋白。

1.2.4 菌株 N5 的盆栽试验 番茄种子用 55℃温水浸种 15 min,10% 双氧水处理 10 min 后用无菌水反复冲洗,在常温下用清水浸泡 4 h,在 30℃培养箱中催芽 2~3 天,然后播种在育苗盘中(其中促生试验育苗基质为蛭石,生防试验育苗基质为无菌土和蛭石(1:1))。待种子长出两片真叶后将其移到营养钵中,在营养钵生长约 3 周后,移至大盆。试验分两次进行,第一批为促生试验,从 2012 年 3 月 29 日到 2012 年 5 月 29 日;第二批为生防试验,从 2012 年 6 月 14 日到 2012 年 8 月 6 日。

两组试验均设 6 个处理,每处理 3 个重复,每个重复 10 盆。6 个处理分别为: CC:营养钵育苗与大盆均施用化肥; CB:营养钵施用化肥,大盆施生物有机肥; OO:营养钵与大盆均施用有机肥;

OB:营养钵施用有机肥,大盆施用生物有机肥;

BC:营养钵施用生物有机肥,大盆施用化肥;

BB:营养钵与化肥均施用生物有机肥。营养钵每钵装土 300 g 生物有机肥和有机肥按土重的 2% 施加,大盆每盆装土 3 kg,生物有机肥和有机肥按土重的 0.5% 施加。化肥处理补齐和有机肥等量的 N、P、K 养分。

促生试验在盆栽试验结束后,每处理随机取 3 株苗,测定其根系活力^[20]、地上部鲜重和干重、地下部鲜重和干重等生物量。番茄株高采用直尺测量从茎基部至最顶端的长度;植株鲜重采用直接称量法;干重采用烘干法,先 105℃杀青 1 h,然后 65℃烘干至恒重。

生防试验时,番茄苗从营养钵移至盆钵后待植株生长 5 天,以灌根法将 300 ml(病原菌数量为 10⁷/ml)病原菌悬液加入土中。每 10 天采集根系样品,测定根际土壤微生物变化。自植株开始发病后,每天记录发病情况并根据以下公式计算病情指数和防治效果:

病情指数 = $[\sum(\text{病级株数} \times \text{代表数值}) / (\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表数值})] \times 100$;

防治效果 = $(\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数} \times 100$

番茄青枯病按发病严重程度分为 5 级^[21]:0 级为叶面无症状;1 级为植株 1/4 以下的叶面表现为萎蔫症状;2 级为植株上 1/4~1/2 叶面表现为萎蔫症状;3 级为植株 1/2 以上叶面表现萎蔫症状;4 级为全株萎蔫死亡。

1.2.5 土壤微生物数量的测定 轻轻抖落黏在番茄植株根系上的土壤后,按每 10 g 根加 90 ml 无菌水的比例放入事先装有玻璃珠的三角瓶中,再将三角瓶放置在摇床上 170 r/min 震荡 30 min,洗脱在无菌水中的土壤即为根际土壤。将大盆土壤充分混匀后,取 300 g 混合样,即为土体土,放入 4℃冰箱中待用。微生物数量采用系列稀释平板法计数^[22]。细菌采用 NA 培养基,放线菌采用高氏 1 号培养基,真菌采用马丁氏培养基。病原菌(茄科劳尔氏菌)采用 SMSA-E 选择性培养基^[23]。

1.3 数据处理

数据统计分析使用 SPSS13.0 统计软件完成,采用邓肯氏新复极差法检验各处理间差异显著性,利用 Microsoft Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选和鉴定

通过初筛、复筛得到对茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)具有明显拮抗效果的 8 株菌,分别编号为 N1、N2、N4、N5、N1056、N9、N10、N11,其中菌株 N5(图 1)的抑菌能力最强,抑菌圈直径达 26 mm,选择 N5 为本研究的试验菌株。



图 1 菌株 N5 在 LB 平板上 30℃培养 16 h 的菌落形态
Fig. 1 Colony morphology of strain N5 growing on the LB plate after 16 h at 30℃

N5 菌株在 LB 平板上 30℃培养 48 h 后,菌落周边不规则,不透明,表面有褶皱。细胞革兰氏染色阳性;过氧化氢酶、V-P 反应阳性;甲基红试验阴性;可以在 pH 9.6 肉汤中生长,可发酵葡萄糖、纤维二

糖、甘露醇、甘露糖、蔗糖、果糖产酸；可水解明胶和淀粉。

通过 PCR 获得了 N5 菌株的 16S rRNA 基因片段并进行了序列测定，将 N5 的 16S rRNA 基因序列提交至 RDP 数据库中进行比对分析，选取同源性较高

的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 2)。结果表明，菌株 N5 与 *Bacillus methylotrophicus* 同源性最高(97.5%)。根据形态特征、生理生化试验以及 16S rRNA 序列分析的结果，将 N5 初步鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)。

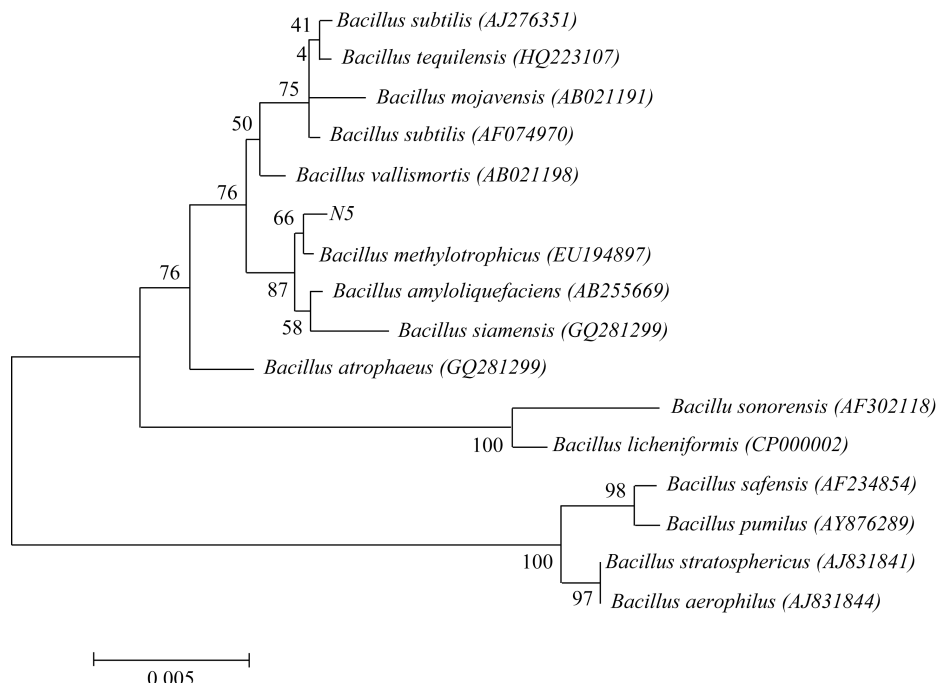


图 2 基于菌株 N5 16S rDNA 序列建立的系统发育树

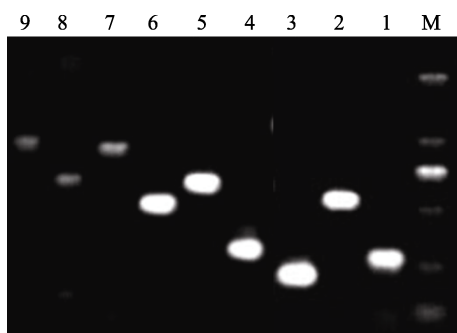
Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain N5 and related strains

2.2 部分脂肽类抗生素合成基因片段的扩增及鉴定

通过 RCR 扩增的方法从拮抗菌株 N5 基因组 DNA 中克隆出 9 个抗生素生物合成基因，包括 *ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*、*Qk*、*fenB*、*fenD*、*srfAB* 和 *yndJ* 基因(图 3)，它们分别为 Iturin、SubtilisinQK、Fengycin、Sufactin 和 Yndj 的生物合成相关基因。

2.3 菌株 N5 与拮抗能力相关的特性

2.3.1 N5 产纤维素酶、嗜铁素、 β -1,3-葡聚糖酶和

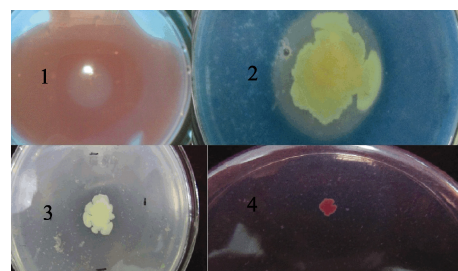


(M：分子量标记物(DL2000)；泳道 1：*yndJ*；泳道 2：*ituC*；泳道 3：*fenD*；泳道 4：*srfAB*；泳道 5：*ituD*；泳道 6：*ituB*；泳道 7：*ituA*；泳道 8：*fenB*；泳道 9：*QK*)

图 3 菌株 N5 抗生素合成基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Agarose gel-electrophoresis of PCR products for antibiotic biosynthesis genes from N5

蛋白酶能力的平板定性试验 如图 4 所示，菌株 N5 能产生铁载体、纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶。铁载体通过和铁络合，使得植物病原细菌缺乏铁而抑制其生长^[24-25]。蛋白酶与 β -1,3-葡聚糖酶可以破坏病原真菌的细胞壁从而抑制病菌的生长或导致病菌解体，是微生物菌株产生拮抗作用的机制之一^[26-27]。培养 6 天后，N5 菌株产生的蛋白酶、纤维素酶其水解圈达 23 mm，产 β -1,3-葡聚糖酶水解圈 31 mm。说明菌株 N5 具有拮抗真菌类病原菌的能力，同时可以通过铁载体的产生抑制青枯菌的生长。

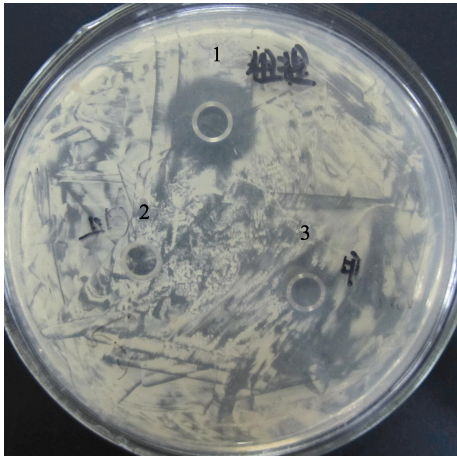


(1：纤维素酶；2：嗜铁素；3：蛋白酶；4： β -1,3-葡聚糖酶)

图 4 N5 产纤维素酶、嗜铁素、 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶

Fig. 4 Production of cellulase, siderophore, β -1, 3-glucanase and protease by Strain N5

2.3.2 脂肽类物质的提取与抗菌活性的检测 采用脂肽类物质的提取方法从菌株 N5 培养液中获得了脂肽类粗提物,拮抗活性测定表明,脂肽类粗提物对病原菌 *R. solanacearum* 具有显著的拮抗活性(图 5)。结合在菌株 N5 中检测到了合成脂肽类物质的基因(图 2),因此,N5 具有合成脂肽类抗菌物质的能力。



(1 : 脂肽粗提物 ; 2 : 酸沉淀后的上清液(pH = 7) ; 3 : 甲醇)

图 5 脂肽类拮抗物质的抑菌效果

Fig. 5 Aantibacterial activity of lipopeptide extracted from strain N5 culture

2.3.3 抑菌蛋白物质的分离与检测 将菌株 N5 培养液的无细胞滤液经不同饱和度硫酸铵分级盐析,获得粗蛋白沉淀,检测不同粗蛋白对番茄青枯病的拮抗活性,结果(表 1)表明,培养液的蛋白质主要存在于 0 ~ 30% 和 30% ~ 50% 饱和度硫酸铵沉淀中,蛋白含量分别达到 7.33 $\mu\text{g/ml}$ 和 8.8 $\mu\text{g/ml}$,而其他组分的蛋白含量较低。拮抗活性测定(表 1、图 6)表明,只有 30% ~ 50% 硫酸铵饱和度的沉淀物具有显著的抑菌活性,说明 N5 拮抗菌可以产生蛋白类拮抗物质。

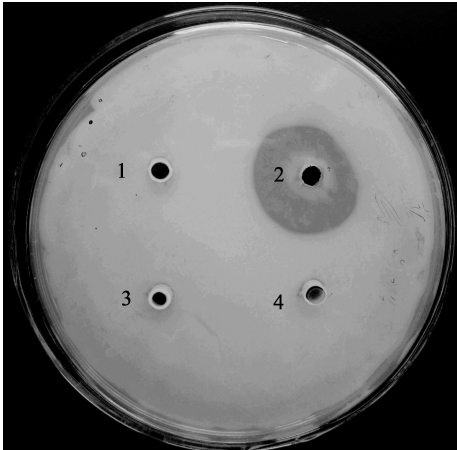
2.4 生物有机肥对番茄的促生效果

2.4.1 生物有机肥对植株生物量的影响 从表 2 可以看出,与单施化肥的处理相比,施加有机肥或生

表 1 N5 发酵液中硫酸铵不同饱和度提取的粗蛋白质浓度及抑菌活性

Table 1 Proteins concentration and inhibition activity to *R. solanacearum* of precipitation fractionation with different saturation ammoniumsulfate

硫酸铵饱和度	蛋白含量($\mu\text{g/ml}$)	抑菌直径(mm)
0 ~ 30%	7.33	0
30% ~ 50%	8.80	20.5
50% ~ 80%	3.13	0
80%~ 100%	1.86	0



(1 : 0 ~ 30% 饱和度 ; 2 : 30% ~ 50% 饱和度 ; 3 : 50% ~ 80% 饱和度 ; 4 : 80% ~ 100% 饱和度)

图 6 N5 发酵液经不同硫酸铵饱和度分级沉淀的抑菌效果

Fig. 6 Inhibitory effect of precipitation fractionation of strain N5 culture by different saturation of ammonium sulfate

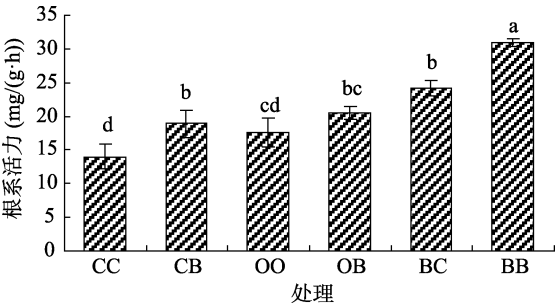
物有机肥的处理能够显著促进番茄植株的生长。其中 BB、CB 和 BC 处理比 CC 处理的地上部鲜重分别增加了 2.27、1.77 和 1.8 倍,根干重分别增加 2.72、1.80 和 1.46 倍。而 OO 处理比 BB、OB 处理根上部干重分别降低 60.8%、30.6%,地下部干重降低 60%、20%。这说明营养钵育苗时开始使用生物有机肥能显著提高植株生物量,并且营养钵育苗和大盆移栽中都施用生物有机肥的效果要明显高于单施生物有机肥。生物有机肥与有机肥相比更能促进植株和根系生长,这说明拮抗菌具有促生作用。

表 2 不同处理对番茄植株生物量的影响
Table 2 Effects of different treatments on tomato plants biomass

处理	地上部鲜重(g/株)	地上部干重(g/株)	根鲜重(g/株)	根干重(g/株)
CC	39.28 $\pm$ 2.62 d	3.71 $\pm$ 0.25 d	4.28 $\pm$ 0.90 d	0.44 $\pm$ 0.07 a
CB	69.59 $\pm$ 6.76 c	7.28 $\pm$ 0.77 c	8.01 $\pm$ 1.15 c	0.79 $\pm$ 0.13 bc
OO	77.72 $\pm$ 2.31 b	7.09 $\pm$ 0.55 b	8.01 $\pm$ 1.15 c	0.75 $\pm$ 0.17 bc
OB	85.68 $\pm$ 0.85 a	9.26 $\pm$ 0.16 a	9.74 $\pm$ 0.81 a	0.90 $\pm$ 0.81 bc
BC	70.78 $\pm$ 1.16 c	6.96 $\pm$ 0.53 c	6.61 $\pm$ 0.91 c	0.64 $\pm$ 0.53 ab
BB	89.18 $\pm$ 2.97 a	11.40 $\pm$ 0.66 a	11.85 $\pm$ 1.39 a	1.20 $\pm$ 0.66 a

注 : 表中数据为平均值 $\pm$ 标准偏差, $n = 3$; 同列不同小写字母表示处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著(LSD)。下同。

2.4.2 施加生物有机肥对番茄植株根系活力的影响 根系活力是根的重要生理指标,活力越高吸收水分和营养的能力越大。从图 7 可以看出,BB 处理的根系活力最强,达 30.93 mg/(g·h),OO 处理为 17.59 mg/(g·h),分别是 CC 处理的 2.2 和 1.3 倍。CB、OB、BB 处理根系活力较 CC、OO、BC 处理增加 56.9%、17.0%、28.0%;而 BC 处理比 CC 处理增加 72.6%。施用生物有机肥和有机肥处理与化肥处理相比均不同程度地增加了番茄植株的根系活力,但有机肥处理与化肥处理差异不显著,生物有机肥可以显著提高根系活力。营养钵与大盆同时施加生物有机肥(BB 处理)不仅显著增加番茄植株根鲜重和干重(表 2),同时增强根系活力,使得植株可以更好地吸收营养物质,这可能是生物有机肥促进植物生长的原因之一。大盆时期施用生物有机肥(CB 处理)依然可以提高根系活力,但营养钵育苗时施加生物有机肥(BC 处理)对根系活力影响更大。营养钵育苗时即施用生物有机肥,有利于拮抗菌抢占生态位,在根际土中定殖,更好地发挥其促生作用、增强根系活力,效果比大盆移栽时再施用有机肥效果更好。以上结果说明生物有机肥可以显著地提高番茄植株根系活力,使植物吸收根际营养的能力增强,从而更好地促进植物旺盛的生长。



(图中误差线为标准偏差, $n=3$; 不同小写字母表示处理间差异在 $P<0.05$ 水平显著)

图 7 不同施肥处理对番茄植株根系活力的影响
Fig. 7 Effects of different fertilizer treatments on tomato root activity

2.5 生物有机肥对番茄的生防效果

加入病原菌后的第 11 天,番茄开始出现发病症状,随后每天观察记录发病状况。结果表明,在移栽 30 天对对照 CC 处理发病率为 97.3%,其余处理的发病率与 CC 处理均有显著性差异,为 29.2%~73.3%(表 3)。单独使用有机肥处理(OO)并不能显著降低番茄青枯病的发病率,发病率仍高达 65.7%;营养钵育苗时使用生物有机肥能明显地降低植株发病率,BC 处理的发病率只有 42.5%,与对照 CC 处理相比,防治率达到 56.3%;而只在大盆使用生物有机

肥的 CB 处理,防治效果只有 24.7%;营养钵育苗与大盆移栽均施用生物有机肥(BB 处理)对番茄青枯病的防治效果最好,发病率只有 29.2%,防治率达到 69.0%。因此,生物有机肥能有效地防治番茄青枯病的发生。由于营养钵育苗时使用的生物有机肥的量很有限,但生防效果比较好,所以是一个值得推广的生防途径。

表 3 不同处理对番茄青枯病的防治效果
Table 3 Control effects of different treatments on tomato bacterial wilt in greenhouse

处理	发病率(%)	防治效果(%)
CC	97.3 ± 1.37 a	—
CB	73.3 ± 1.88 b	24.7 ± 1.93 a
OO	65.7 ± 2.40 c	32.5 ± 2.47 b
OB	41.7 ± 1.46 d	57.1 ± 1.50 c
BC	42.5 ± 2.35 d	56.3 ± 2.41 c
BB	29.2 ± 1.73 e	69.0 ± 1.78 a

2.6 病原菌在番茄植株根际土壤中的动态变化

从图 8 可以看出,在加入病原菌后的 30 天内,各处理的病原菌数量均保持增长趋势,但是变化幅度有较大差异。BB 处理的根际病原菌数量级始终控制在 10^6 cfu/g 土以内,从第 10 天的 1.4×10^6 cfu/g 土到 30 天时为 7.1×10^6 cfu/g 土,增加了 5.1 倍。而 CC 处理的根际病原菌数量始终比 BB 处理高出一个数量级,而且从第 10 天的 10.1×10^6 cfu/g 土到 30 天时的 90.1×10^6 cfu/g 土,增加了 8.9 倍。OO 处理的病原菌数量处于较高水平,只是比 CC 处理稍低,因此单纯施加有机肥并不能有效抑制病原菌的生长,这与有机肥丰富的养分促进微生物生长繁殖有一定关系。CB、BC、OB 处理比 OO、CC 的病原菌数量减少了 57.6%~79.7%,说明不管营养钵育苗时施用生物有机肥还是大盆施用生物有机肥,均能显著抑制病原菌的繁殖,其中营养钵与大盆同时施用生物有机肥能更好地控制病原菌的数量,从而降低植株发病率,达到防治青枯病的效果(表 3)。

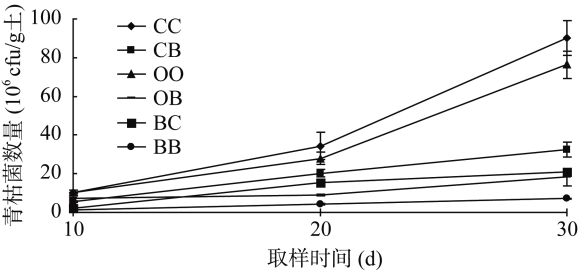


图 8 不同处理对番茄根际病原菌的数量变化
Fig. 8 Population of *R. solanacearum* in tomato rhizosphere under different treatments

2.7 不同施肥处理对番茄根际土和土体土土壤微生物数量的影响

不同处理对番茄植株根际微生物群落结构的影响不同。从表 4 可以看出, CB、BC 和 BB 处理的根际细菌、放线菌数量显著高于 CC 处理, 而真菌数量则低于 CC 处理。而营养钵育苗或大盆使用有机肥的处理(OO, OB)其根际细菌、放线菌和真菌数量均显著高于 CC 处理。另外, 营养钵和大盆中均施用生物有机肥的处理(BB)细菌、放线菌数量要显

著高于营养钵或大盆单独施用生物有机肥的处理(CB, BC)。不同处理土体土中细菌、放线菌数量变化趋势与根际土中数量变化趋势相一致, 只是在数量变化程度上比根际土要小。说明施用生物有机肥对番茄根系和土壤微生物群落有显著影响, 使土壤中放线菌和细菌数量显著增加。菌株 N5 具有产脂肽类拮抗物质的能力, 同时可以产 β -1,3-酶等抑制病原真菌, 使得生物有机肥处理的真菌数量有所降低。

表 4 不同处理对番茄根际土和土体土土壤微生物数量的影响
Table 4 Microbial number in rhizosphere and bulk soil under different treatments

处理	根际土微生物(cfu/g 土)			土体土微生物(cfu/g 土)		
	细菌(10^7)	放线菌(10^6)	真菌(10^4)	细菌(10^7)	放线菌(10^6)	真菌(10^4)
CC	2.2 ± 0.08 d	1.4 ± 0.29 c	7.3 ± 0.14 b	3.7 ± 0.31 ab	1.0 ± 0.50 d	2.7 ± 0.37 e
CB	4.9 ± 0.98 c	1.5 ± 0.32 c	2.8 ± 0.23 e	3.1 ± 0.25 b	3.4 ± 0.49 ab	5.5 ± 0.55 bc
OO	6.3 ± 0.84 bc	4.2 ± 0.49 b	7.8 ± 0.54 ab	3.7 ± 0.84 ab	2.2 ± 0.59 c	6.9 ± 0.46 a
OB	8.0 ± 0.42 a	4.6 ± 1.02 b	8.2 ± 0.49 a	3.5 ± 0.58 ab	3.7 ± 0.68 a	6.6 ± 1.12 ab
BC	5.0 ± 1.18 c	4.9 ± 1.44 b	5.7 ± 0.53 c	3.1 ± 0.19 b	2.4 ± 0.43 bc	3.8 ± 0.56 de
BB	7.0 ± 1.09 ab	7.7 ± 0.75 a	4.6 ± 0.37 d	4.1 ± 1.1 a	4.1 ± 0.74 a	4.9 ± 0.59 cd

3 讨论

本文首次报道了甲基营养型芽孢杆菌对番茄青枯病的防治作用。该菌具有产生多种脂肽类抗菌物质和抗菌蛋白的能力, 同时能分泌铁载体、纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶等抗病类物质。经研究发现与施用化肥或单施有机肥相比, 拮抗菌与有机肥制成的生物有机肥对番茄青枯病的防病效果更好, 其中营养钵和大盆均使用生物有机肥的处理其防病效果最好, 防病率达到 69.0%。

有机肥能为拮抗微生物提供养分, 使其在土壤中更好地生长, 有效抑制病原菌的生长, 从而达到降低病害的发生。单一的有机肥或拮抗菌能抑制病原菌, 但不能将病原菌抑制在不发病或者不会引起重大经济损失的阈值内。李胜华等^[9-11]及何欣等^[28]的研究也证明将有机肥和拮抗菌结合起来, 可以起到更好的防病效果。

本研究表明, 施用生物有机肥显著增加根际土壤中放线菌、细菌数量, 有效抑制病原细菌的生长。BB 处理根际土壤的放线菌、细菌数量比其他处理都有显著的增加, 根际土壤中病原菌的数量(数量级为 10^6 cfu/g)与其他处理相比降低一个数量级, 差异显著, 这与丁传雨等^[10]的研究结果是一致的。蔡燕飞等^[29]的研究也表明施用生物有机肥能调控土壤微生物群落结构, 促进有益微生物的生长, 增强土壤生态

系统的稳定性和抑病性, 从而提高了土壤质量。这表明生物有机肥中的有益菌和其他有益物质一定程度上限制病原菌的生长, 调控根际微生物的组成, 抑制病害的发生。

参考文献:

[1] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65-87

[2] 刘琼光, 曾宪铭. 茄科蔬菜青枯病的综合防治技术: 蔬菜病虫害的综合治理(十八) [J]. 中国蔬菜, 1999, 96(6): 51-52

[3] 林尤剑, 顾刚, 陈顺辉. 作物青枯病防治研究的现状与对策[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(3): 297-303

[4] 黎志坤, 朱红惠. 一株番茄青枯病生防菌的鉴定与防病、定殖能力初探[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 342-349

[5] 张彦, 车建美, 刘波, 唐乐尘. 蜡样芽孢杆菌 ANTI-8098A 在番茄内的定殖和对青枯病的防治研究[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 221-227

[6] Lian LL, Xie LY, Wu ZJ, Xie LH, Duan YP. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* SB1 and its biocontrol effect on tomato bacterial wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(2): 219-224

[7] Schönfeld J, Gelsomino A, Overbeek LS, Gorissen A, Smalla K, Elsas JD. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia Solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil[J]. Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 63-74

- [8] 隋学超, 卜崇兴, 郭世荣, 朱雨薇, 梁勇, 周静波. 基质中添加有机缓释肥对番茄青枯病防效影响[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 85-88
- [9] 李胜华, 谷丽萍, 刘可星, 廖宗文. 有机肥配施对番茄土传病害的防治及土壤微生物多样性的调控[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(4): 965-969
- [10] 丁传雨, 乔焕英, 沈其荣, 冉炜, 陈巍. 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
- [11] Zhong W, Yang XM, Shixue Yin, Shen QR, Ran W, Xu YC. Efficacy of Bacillus-fortified organic fertilizer in controlling bacterial wilt of tomato in the field[J]. Applied Soil Ecology, 2011, 48(2): 152-159
- [12] 赵斌, 何绍江. 微生物学试验[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] Desmond ST. An Introduction to Genetic Engineering[M]. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2008
- [15] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- [16] Cao Y, Xu ZH, Ling N, Yuan YJ, Yang XM, Chen LH, Shen B, Shen QR. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135: 32-39
- [17] Milagres AMF, Napoleão D, Machuca A. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37(1): 1-6
- [18] 郭勇. 现代生化技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [20] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 武汉: 华中农业大学出版社, 2000
- [21] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [22] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [23] Bellstedt DU. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of *Ralstonia solanacearum* in potatoes: The south African experience[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 508: 51-62
- [24] DB Alexander, DA Zuberer. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria[J]. Biology and Fertility of Soils, 1991, 12(1): 39-45
- [25] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka E A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, prospects, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4 951-4 959
- [26] Hofemeister J, Conrad B, Adler B, Hofemeister B, Feesche J, Kucheryava N, Steinborn G, Franke P, Grammel N, Zwintscher A, Leenders F, Hitzeroth G, Vater J. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272(4): 363-378
- [27] Delacruz J, Pintorero JA, Benitez T, Llobell A. Purification and characterization of an endo-beta-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism[J]. Journal of bacteriology, 1995, 177(7): 1 864-1 871
- [28] 何欣, 郝文雅, 杨兴明, 沈其荣, 黄启为. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防治的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(4): 978-985
- [29] 蔡燕飞, 廖宗文, 章家恩, 孔维栋, 何成新. 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

Characterization and Biological Effects of Antagonistic N5 Against *Ralstonia solanacearum*

WANG Hong-mei, WU Yun-cheng, SHEN Biao^{*}

(Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A bacterial strain N5, showing strong antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum* was isolated from soil. Strain N5 was primarily identified as *Bacillus methylotrophicus* based on its biochemical and physiological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. Strain N5 could produce siderophores, β -1,3-glucanase, cellulase and protease, and also had ability to produce some lipopeptide antibacterial substances. Strain N5 was inoculated into organic fertilizer (pig manure : amino acid fertilizer = 1 : 1) to ferment 4 days to make bio-organic fertilizer. Bio-organic fertilizer was estimated by pot experiment for its biocontrol capacity to tomato bacterial wilt disease. The results demonstrated that application of bioorganic fertilizer could significantly promote tomato growth and increased root activity. Application of bioorganic fertilizer could effectively biocontrol tomato bacterial wilt disease. The control efficiency of treatments in which bioorganic fertilizer was applied only in nursery was higher than that in treatments in which bioorganic fertilizer was applied only in pot soil. Application of bioorganic fertilizer both in nursery and pot soil could much more effectively biocontrol tomato bacterial wilt disease with efficiency of 69%, but common organic fertilizer could not control tomato bacterial wilt disease. Application of bioorganic fertilizer could significantly increase the number of bacteria and actinomyces and reduce the number of fungi and *Ralstonia solanacearum* in rhizosphere soil compared to control.

Key words: Isolation of antagonistic bacterial strain, Characterization, Tomato bacterial wilt, *Bacillus methylotrophicus*, Biological organic fertilizer, Biocontrol