

两株生防菌对连作土壤中黄瓜生长及微生物的影响

张俊英¹, 许永利²

(1. 河北联合大学 化学工程学院, 河北 唐山 063009; 2. 河北联合大学 矿业工程学院, 河北 唐山 063009)

摘 要:以黄瓜连作 11 年大棚土壤为研究对象, 研究采用室内盆栽的方法, 通过接种低浓度(10^6 个/mL)和高浓度(10^9 个/mL)的枯草芽孢杆菌和哈茨木霉, 研究了 2 株生防菌对连作黄瓜土壤中黄瓜生长及土壤微环境变化的影响。结果表明: 接种高浓度的枯草芽孢杆菌和哈茨木霉后, 黄瓜叶片叶绿素含量、叶片光合速率、地上部干重、根长和根体积均显著增加, 叶片发病率降低。接种后植物根际微生物类群受养分影响减弱, 除了放线菌和真菌受到速效磷和速效钾的影响明显外, 细菌与速效养分相关性不大。试验表明, 黄瓜连作土壤接种 2 株生防菌后, 促进了植物根系和地上部的生长, 降低了植物发病率, 尤其接种高浓度的枯草芽孢杆菌和哈茨木霉效果显著。

关键词:设施黄瓜; 生防菌; 连作土壤; 哈茨木霉; 枯草芽孢杆菌; 土壤养分

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)15-0028-04

土壤连作常常导致土壤理化性质变差, 如盐分增加^[1-2]、病虫害增加, 进而导致连作障碍^[3]。黄瓜作为我国主要的蔬菜之一, 栽培面积大, 设施栽培连作严重, 导致产品品质下降, 土壤理化性质变差, 病虫害加剧。吴凤芝等^[4]研究表明, 设施黄瓜连作土壤的微生物群落多样性指数、丰富度及其均匀度指数随连作年限增加而降低, 产量下降。研究表明, 含有绿色木霉菌 T23 与哈茨木霉菌 Ta22 及少量营养元素的木霉菌剂可有效抑制黄瓜枯萎病, 对大棚黄瓜枯萎病的相对防效达到 66.04%^[5]。枯草芽孢杆菌 CS16 可抑制多种病原真菌和细菌, 尤其对真菌抑制作用较强^[6]。该研究旨在通过

生防菌的添加, 研究其对于设施连作土壤中蔬菜生长和根际生态环境的影响, 为设施蔬菜连作土壤的改良和病虫害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤取自唐山市某黄瓜连作 11 年大棚。土壤基本理化性状见表 1。

供试黄瓜“夏秋绿三号秋瓜”, 购自唐山市农业科学院。

供试菌种: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)均购自中科院微生物所。

表 1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of soil tested in experiment

有效氮 AN ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有效磷 AP ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有效钾 AK ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	细菌数 B ($10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	真菌数 F ($10^4 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	放线菌数 A ($10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)
673.14	131.05	270.31	2.17	2.53	1.20

1.2 试验方法

试验处理: 添加枯草芽孢杆菌和哈茨木霉, 浓度分别为枯草芽孢杆菌 10^6 个/mL(B6)、 10^9 个/mL(B9)或哈茨木霉孢子 10^6 个/mL(F6)、 10^9 个/mL(F9)。每处理每盆添加量为 15 mL。枯草芽孢杆菌使用牛肉膏蛋白

胨培养基培养^[7]。哈茨木霉使用 PDA 培养基平板培养 3~5 d, 将孢子用无菌水冲洗下来, 稀释至所需浓度后用于接种^[8]。

研究采用室内盆栽的方法进行。选择饱满的黄瓜种子, 用 10% 的 H_2O_2 消毒 10 min, 然后用去离子水冲洗干净, 置于湿纱布上于 28℃ 黑暗条件下催芽。待种子露白后, 播种于装有 1 kg 连作土壤的塑料盆中, 每盆播种 3 粒, 出苗后每盆留 1 棵。黄瓜幼苗生长到 20 d 时接种生防菌, 设置不接种作为对照(CK)。每处理重复 3 次。于苗龄 24 d 时接种生防菌, 采用直接灌根法。

第一作者简介:张俊英(1976-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事设施蔬菜土壤改良与修复等研究工作。E-mail: jyzh694@126.com.

基金项目:唐山市科技成果转化资助项目(13G03-3)。

收稿日期:2015-01-21

1.3 项目测定

植物叶片叶绿素含量用叶绿素仪测定;植物光合强度用 LI-6400 测定;根系长度、表面积和体积利用 WinRHIZO 根系分析系统测定。土壤速效磷和速效钾参照鲁如坤^[9]的方法;土壤细菌数量用牛肉膏蛋白胨培养基测定;土壤真菌用马丁孟加拉红培养基测定;土壤放线菌用高氏一号培养基测定^[10]。

1.4 数据分析

采用 Excel 2010 作图,利用 SPSS 17 进行相关性统计分析。

2 结果与分析

2.1 生防菌对黄瓜生长的影响

2.1.1 对黄瓜植株株高变化的影响 从图 1 可以看出,接种生防菌后,各处理株高明显高于对照(CK),说明生防菌的接种促进了植物的生长,可能因为生防菌的生长代谢促进了根际土壤养分的释放,加快了黄瓜幼苗的生长速度。而且,接种 10^6 个/mL(F6)的哈茨木霉对株高的

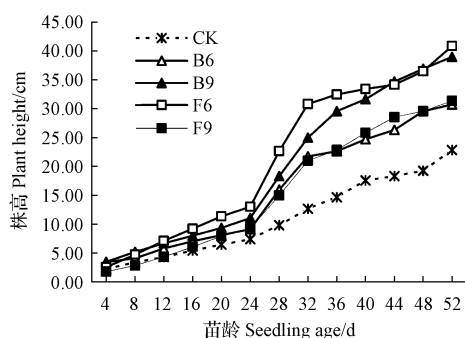


图 1 黄瓜株高变化

Fig. 1 Change of plant height of cucumber seedling

表 2

接种后黄瓜叶片性状变化

Table 2

Cucumber leaves change after incubation of bio-control microbes

处理 Treatment	叶片数 Number of leaves/片	枯萎叶片数 Number of disease leaves/片	叶绿素 Chlorophyll SPAD	净光合速率 Net photosynthetic rate/(CO ₂ $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	发病率 Incidence of disease/%	防效 Prevention efficiency/%
CK	13 a	5 a	11.03 c	4.63 b	38 a	—
B6	13 a	3 ab	14.02 b	5.91 a	23 ab	39.47
B9	12 a	2 b	16.92 a	6.83 a	16 b	57.89
F6	12 a	4 a	14.53 b	3.50 c	25 a	34.21
F9	14 a	3 ab	17.29 a	4.86 b	21 ab	44.74

表 3

收获后黄瓜生物量等指标的变化

Table 3

Growth of cucumber in continuous cropping soil after harvested

处理 Treatment	地上部 Shoot/(g·株 ⁻¹)		根系 Root/(g·株 ⁻¹)		根长	根表面积	根体积
	鲜重 FW	干重 DW	鲜重 FW	干重 DW	Root length/cm	Root superficial area/cm ²	Root volume/cm ³
CK	21.16 a	13.62 c	0.21 a	0.06 a	352.5 d	156.5 c	7.37 b
B6	21.24 a	16.33 b	0.20 a	0.06 a	618.1 a	313.5 b	12.66 a
B9	23.49 a	19.75 a	0.28 a	0.09 a	600.7 a	316.7 b	13.28 a
F6	21.05 a	16.17 b	0.20 a	0.05 a	512.5 b	377.3 a	11.94 a
F9	21.13 a	13.91 c	0.21 a	0.05 a	431.8 c	167.3 c	5.16 b

注:FW-鲜重,DW-干重。

Note:FW-fresh weight,DW-dry weight.

促进作用最好,在接种后 4 d 即表现出较强的促进作用,明显高于其它处理。接种后 20 d 时,浓度为 10^6 个/mL(B9)枯草芽孢杆菌的促进作用与 F6 基本持平。但哈茨木霉的促进作用出现更早、更稳定。

2.1.2 对黄瓜叶片性状及生物量变化的影响 由表 2 可以看出,黄瓜幼苗接种生防菌后,叶绿素含量显著上升,B6、B9、F6、F9 分别比对照叶绿素值提高了 27.1%、53.4%、31.7%、56.8%,差异显著($P<0.05$)。可见,接种生防菌的数量对叶绿素的作用更显著,相同接种量的 2 种生防菌之间叶绿素数值无显著差异。黄瓜叶片的净光和速率则以枯草芽孢杆菌较高,B6 和 B9 分别比对照高 27.7%和 47.5%,差异显著($P<0.05$)。接种生防菌也降低了黄瓜发病率,其发病率由低到高依次为 $B9<F9<B6<F6$,依次比对照下降了 57.9%、44.7%、39.5%、34.2%,差异显著($P<0.05$)。B9 处理的防效达到 57.89%;F9 处理的防效达到 44.74%,均比低浓度下同种菌处理防效要高,说明高浓度的生防菌提高了植物的防病效率。黄瓜生长 50 d 后收获,由表 3 可以看出,地上部干重以 B9 最高,B6、F6 其次,F9 和 CK 较低,根系干重均无显著差异,说明枯草芽孢杆菌接种更利于地上部干物质的积累,B9 比 CK 干物质显著增加 45.0%($P<0.05$)。黄瓜根长、根体积等则均以枯草芽孢杆菌 2 个接种量较高,B6 和 B9 黄瓜根长分别比 CK 黄瓜根长显著增加了 75.3%和 70.4%($P<0.05$),根体积则分别比 CK 显著增加 71.8%和 80.2%($P<0.05$);根表面积则以哈茨木霉低接种量最高,比对照显著增加 1.4 倍($P<0.05$)。说明哈茨木霉比枯草芽孢杆菌更能促进黄瓜根表面积的增加;而枯草芽孢杆菌则更有利于根长和根体积的增加。

2.2 生防菌对黄瓜根际土壤的影响

2.2.1 土壤速效养分的变化 由表 4 可以看出,接种生防菌后,土壤速效磷降幅以 B9 和 F6 较大,达到 75%以上,而对照仅 61.8%。说明了高浓度的枯草芽孢杆菌和低浓度的哈茨木霉有利于植物对磷的吸收,利于植物的生长。土壤中速效钾的含量在处理间差异不明显,主要

是 F6 和 B9 含量较低,可能是生防菌促进了黄瓜幼苗对土壤钾的吸收,导致土壤速效钾含量大幅下降。以 B9 处理和 F6 处理速效钾含量降幅较大,说明生防菌促进了植物对钾的吸收,比对照吸收效果好。可见,2 株生防菌中,枯草芽孢杆菌高浓度更利于植物对磷钾的吸收,而哈茨木霉则低浓度时更利于植物对磷钾的吸收。

表 4 土壤速效养分含量的变化及降幅

Table 4 Soil available P and available K contents and decrease under incubation of different bio-control microbes

含量 Content /(mg · kg ⁻¹)	苗龄 Seedling age /d	CK	降幅 Decrease /%	B6	降幅 Decrease /%	B9	降幅 Decrease /%	F6	降幅 Decrease /%	F9	降幅 Decrease /%
速效磷 Available P	1	131	—	131	—	131	—	131	—	131	—
	26	70	46.6	69	47.3	72	45.0	83	36.6	80	38.9
	33	68	48.1	62	52.7	68	48.1	78	40.5	64	51.2
	41	58	55.7	52	60.3	60	54.2	54	58.8	60	54.2
	46	50	61.8	45	65.6	32	75.6	27	79.4	48	63.4
速效钾 Available K	1	270	—	270	—	270	—	270	—	270	—
	26	243	10.0	240	11.1	234	13.3	229	15.2	248	8.2
	33	240	11.1	222	17.8	201	25.6	212	21.5	237	12.2
	41	215	20.4	214	20.7	178	34.1	169	37.4	202	25.2
	46	199	26.3	182	32.6	154	43.0	143	47.0	169	37.4

2.2.2 土壤微生物数量的变化 表 5 为接种生防菌后土壤细菌数量随苗龄的变化,可以看出细菌数量以接种枯草芽孢杆菌对土壤细菌数量的增加较为明显,接种哈茨木霉尤其是高浓度哈茨木霉对土壤细菌数量影响不大,接种低浓度哈茨木霉则有一定程度增加,这可能与哈茨木霉促进土壤养分释放,从而间接为土壤细菌提供了养分有关。真菌数量主要受到接种的哈茨木霉影响较大,这可能是因为哈茨木霉大量接种,菌丝分布广泛,占据大量空间,成为主要的真菌类群。所以,真菌数量与接种的哈茨木霉关系密切,但是以接种 10⁶ 哈茨木霉效果更好些。接种生防菌后,放线菌数量增加,在接种后 10 d 效果开始出现,生防菌处理的土

壤放线菌数量高于对照,且随着苗龄增加,生防菌处理土壤的放线菌数量基本稳定在一个水平,说明生防菌的接种有利于土壤微生物的稳定。而对照土壤的放线菌数量则随幼苗生长逐渐减少。从微生物的 B/F 值可知,加入生防细菌的处理大大提升了细菌所占比例;而接种生防真菌的处理则显著降低了 B/F 值。而对于 A/F 值,接种生防真菌的处理则维持在 1.1 上下,说明真菌尤其是哈茨木霉成为优势菌群,占据了大部分的真菌位置,不利病原真菌的生长。接种生防细菌的处理则持续升高至 20,说明细菌的接种不仅促进土壤细菌数量增加,而且提高了放线菌的数量,使土壤真菌数量比例下降,这更有利于生物防病。

表 5 土壤微生物数量随生防菌接种时间的变化

Table 5 Microbe population change with days after incubation of bio-control microbes

数量 Quantity/(CFU · g ⁻¹ 土)	日期 Date/月-日	CK	B6/(10 ⁶ CFU · mL ⁻¹)	B9/(10 ⁶ CFU · mL ⁻¹)	F6/(10 ⁶ CFU · mL ⁻¹)	F9/(10 ⁶ CFU · mL ⁻¹)
细菌 Bacteria	04-29	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05
	05-06	7.05	7.77	8.42	7.26	7.05
	05-14	6.81	7.63	8.20	7.10	6.98
	05-19	6.32	7.51	7.82	6.98	6.71
	04-29	5.68	5.68	5.68	5.68	5.68
真菌 Fungi	05-06	5.59	5.38	5.45	6.89	6.74
	05-14	5.42	5.02	5.00	6.59	6.33
	05-19	5.18	4.74	4.82	6.46	6.10
	04-29	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31
	05-06	6.12	6.25	6.39	6.38	6.40
放线菌 Actinomycetes	05-14	5.59	6.24	6.27	6.30	6.38
	05-19	5.08	6.05	6.13	6.10	5.98

2.3 微生物数量与土壤养分相关性分析

从表 7 可以看出,在不接种生防菌时,3 种主要微生物类群与速效磷和速效钾呈显著或极显著正相关,真菌

和放线菌对速效磷的影响更为显著,放线菌对速效钾的影响更为显著。接种枯草芽孢杆菌后,真菌数量依然极显著受到速效磷的影响,显著受到速效钾的影响,随着

菌种接种量增加,其受速效钾的影响增大。接种哈茨木霉的处理下,真菌数量受养分影响较小。可见,接种生防菌后微生物的数量主要受到外来生防菌的影响,受养分的影响减弱,尤其是大量接种外来菌种,对于同类菌群的影响较大,这可能因为外来菌与土著菌之间的竞争有关。

表 6 土壤微生物的 B/F 值和 A/F 值

Table 6		Ratio of B/F and A/F in soil						
处理	B/F				A/F			
Treatment	04-29	05-06	05-14	05-19	04-29	05-06	05-14	05-19
CK	23.4	29.3	24.7	13.6	4.3	3.4	1.5	0.8
B6	23.4	248.6	405.9	582.2	4.3	7.5	16.5	20.0
B9	23.4	931.9	1 590.9	997.3	4.3	8.8	18.5	20.5
F6	23.4	2.3	3.2	3.4	4.3	0.3	0.5	0.4
F9	23.4	2.0	4.4	4.1	4.3	0.5	1.1	0.8

表 7 微生物数量与土壤养分的相关性分析(Pearson 相关系数)

Table 7 Pearson correlation between microbial population with soil available P and available K

数量	CK		B6		B9		F6		F9	
	AP	AK	AP	AK	AP	AK	AP	AK	AP	AK
B	0.963 *	0.953 *	-0.511	-0.471	-0.075	-0.579	0.786	0.411	0.950 *	0.939
F	0.991 **	0.983 *	1.000 **	0.963 *	0.854	0.969 *	-0.042	-0.497	-0.151	0.008
A	0.998 **	0.994 **	0.867	0.965 *	0.931	0.679	0.965 *	0.740	0.808	0.788

注:B-细菌;F-真菌;A-放线菌;**表示极显著相关($P<0.01$);*表示显著相关($P<0.05$)。

Note:B-bacterium;F-fungi;A-actinomyces; ** show very significant correlation($P<0.01$); * show significant correlation($P<0.05$).

3 结论

连作黄瓜土壤施用生防菌枯草芽孢杆菌和哈茨木霉后,可显著提高黄瓜叶片和植株的生长,降低枯萎病发病率,提高土壤微生物数量,有效改善连作土壤根际微环境。高浓度的枯草芽孢杆菌和哈茨木霉效果明显,为设施黄瓜连作土壤的改良提供了有效的改良措施。

参考文献

- [1] 刘德,吴凤芝.哈尔滨市郊蔬菜大棚土壤盐分状况及其影响[J].北方园艺,1998(6):1-3.
- [2] 高丽红.保护地土壤次生盐渍化对主要蔬菜生长发育的影响[J].南京农业大学学报,1998,12(3):69-71.
- [3] 驹田旦.持续性农业和土壤病害管理[J].系统农业,1994,10(2):18-22.
- [4] 吴凤芝,王学征.设施黄瓜连作和轮作中土壤微生物群落多样性的

变化及其与产量品质的关系[J].中国农业科学,2007,40(10):2274-228.

- [5] 程莹,白寿发,庄敬华,等.木霉菌多功能生防菌剂对瓜类枯萎病的防效研究[J].现代农业科技,2010(23):157-158.
- [6] 李占飞,林陈强,张慧,等.枯草芽孢杆菌 CSL6 抑菌活性与胞外产物成分分析[J].热带作物学报,2013,34(6):1155-1160.
- [7] 范文艳,陈瑾,姜述君,等.复合生防菌群对连作大豆根际土壤可培养微生物区系的影响[J].中国油料作物学报,2012,34(3):286-293.
- [8] 尹丹韩,高观朋,夏飞,等.生防菌哈茨木霉对黄瓜根围土壤细菌群落的影响[J].中国农业科学,2012,45(2):246-254.
- [9] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [10] 中科院南土所微生物研究室.土壤微生物研究法[M].北京:科学出版社,1985.

Effect of Bio-control Bacteria and Fungus on Cucumber Growth and Soil Microbial Population in Continuous Cropping Soil

ZHANG Junying¹, XU Yongli²

(1. College of Chemistry Engineering, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063009; 2. College of Mining Engineering, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063009)

Abstract: With 11 years continuous cropping soil as research object, effects of two bio-control strains, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*, on cucumber seedlings and soil microbes population were tested under pot experiment with continuous cropping soil of cucumber. Two levels, 10^6 or 10^9 of per millilitre, of each bio-control microbe were designed to obtain proper incubated concentration into soil. The results showed that cucumber growth factors increased stimulated significantly in high concentration of inoculation of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*, such as chlorophyll, photosynthetic rate, shoot dry weight, root length and root volume and so on. At the same time, the incidence of disease of leaves wilt decreased significantly with bio-control microbe than without (CK). There were significant correlation between microbial population with available phosphorus or potassium, as actinomyces and fungi. In short, incubation of bio-control *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* stimulated cucumber seedling growth in continuous cropping soil and decreased incidence disease of leaves, especially in high concentration incubation.

Keywords: facilities of cucumber; bio-control microbes; continuous cropping soil; *Trichoderma harzianum*; *Bacillus subtilis*; soil nutrient