

DOI: 10.11766/trxb202008310357

王孝芳, 梅新兰, 黄大鹏, 徐大兵, 杨天杰, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 生物质炭载体联合有益菌防控番茄土传青枯病的效果研究[J]. 土壤学报, 2022, 59 (2): 536–544.

WANG Xiaofang, MEI Xinlan, HUANG Dapeng, XU Dabing, YANG Tianjie, WEI Zhong, XU Yangchun, SHEN Qirong. Effects of Probiotics with Biochar as Carrier Inhibiting Tomato Soil-borne Bacterial Wilt[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (2): 536–544.

生物质炭载体联合有益菌防控番茄土传青枯病的效果研究*

王孝芳¹, 梅新兰¹, 黄大鹏¹, 徐大兵², 杨天杰¹, 韦中^{1†}, 徐阳春¹, 沈其荣¹

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院/作物免疫重点实验室/江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/资源节约型肥料教育部工程研究中心/国家有机类肥料工程技术研究中心, 南京 210095; 2. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064)

摘要: 土传青枯病是由青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的一种细菌性病害。根际有益细菌在青枯病的防控中发挥着重要作用, 其在根际有效定殖是发挥生防作用的前提。以玉米秸秆、木块 (松木) 和稻壳为原料制成的 3 种生物质炭为有益菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 的载体, 探究生物质炭对有益菌防控番茄土传青枯病效果的影响, 并利用室内模拟试验探究生物质炭对青枯菌的吸附、固持以及对根系分泌物的吸附作用, 旨在阐述施用生物质炭提升有益菌 T-5 抑制病原青枯菌能力的可能机制。温室试验结果表明: 单独施用 3 种生物质炭均显著降低青枯病的发病率和根际青枯菌的数量, 其中具有高比表面积の木块生物质炭的防控效率达到 60.56%。3 种生物质炭作为有益菌 T-5 的载体均能够显著提升有益菌 T-5 的根际定殖数量及其防病效率, 其中木块生物质炭的提升效果最好。与仅接种青枯菌的对照相比, 木块生物质炭与有益菌 T-5 组合处理的根际青枯菌数量降幅达 97.42%; 与单独有益菌 T-5 处理相比, 有益菌 T-5 以木块生物质炭为载体使其根际定殖数量提高了 5.71 倍。进一步研究发现, 木块生物质炭能够有效吸附青枯菌, 吸附量接近 90.00%, 且能够有效固持吸附的青枯菌, 青枯菌的逃离降低了 96.66%。此外, 生物质炭不仅可以有效吸附根系分泌物, 且有益菌 T-5 能够有效利用这些根系分泌物并抑制青枯菌的生长。生物质炭作为生防有益菌的载体, 促进根际有益菌的定殖能力, 并吸附、固持病原菌, 有效抑制土传青枯病的发生。

关键词: 土传青枯病; 生物质炭载体; 有益菌; 根系分泌物; 生物防控

中图分类号: S144 **文献标志码:** A

* 国家重点研发计划项目 (2018YFD0201401)、国家自然科学基金项目 (42007025) 和江苏省自然科学基金项目 (SBK2020042856) 资助 Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2018YFD0201401), the National Natural Science Foundation of China (No. 42007025) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (No. SBK2020042856)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: weizhong@njau.edu.cn

作者简介: 王孝芳 (1990—), 女, 安徽人, 副教授, 主要从事土壤微生物与土传病害防控研究。E-mail: wangxf@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-08-31; 收到修改稿日期: 2020-12-21; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-03-02

Effects of Probiotics with Biochar as Carrier Inhibiting Tomato Soil-borne Bacterial Wilt

WANG Xiaofang¹, MEI Xinlan¹, HUANG Dapeng¹, XU Dabing², YANG Tianjie¹, WEI Zhong^{1†}, XU Yangchun¹, SHEN Qirong¹

(1. College of Resources and Environmental Science Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Plant Immunity, Jiangsu Provincial Key Lab of Organic Solid Waste Utilization, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Waste Resource Utilization, Educational Ministry Engineering Center of Resource-saving Fertilizers, National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: 【Objective】Tomato wilt is a kind of destructive soil-borne disease caused by *Ralstonia solanacearum*. In controlling the disease, rhizosphere probiotic play an important role. They reduce pathogen density and dull disease dynamics via resource competition and competitive exclusion. Their effective colonization in the rhizosphere is the precondition of their wilt controlling effect. As a porous material with adsorptive properties, biochar is used as a promising strategy to improve soil structure and fertility. Moreover, biochar has a great potential to inhibit soil-borne diseases, by transferring root exudates off rhizosphere and providing shelter for probiotics. To improve biocontrol efficiency of the probiotics, it is proposed that biochar is used as a carrier to improve their colonization in rhizosphere. 【Method】In this study, wilt controlling effect of the application of biochar and probiotics in combination was evaluated and mechanisms underlying the potential were explored. To the end, a pot experiment was conducted to test three different kinds of biochar (derived from maize straw, pine wood and rice husk, separately) applied together with probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 in controlling tomato bacterial wilt. And then an in-lab experiment was carried out too to measure efficiencies of the biochars adsorbing of pathogens and tomato root exudates *in vitro*. In the end, resource competition and direct toxin production of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 and their effects on pathogens were determined with simulated root exudates. 【Result】Among the three kinds of biochar, the one derived from wood biochar is the highest in specific surface area (SSA) and absorption capacity, reaching up to 395.88 mm² and 116.4 mg·g⁻¹, respectively. The pot experiment showed that the application of biochar, regardless of kind, significantly reduced the incidence of bacterial wilt and pathogen density in rhizosphere. Wood biochar performed the best. When applied alone it decreased the incidence of bacterial wilt by 60.56%, and when applied in combination with probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* T-5, it reduced pathogen density by about 97.42%, while increasing probiotic colonization by about 5.71 times. In exploring mechanisms of such potentials, it was found that 1) Biochar effectively adsorbed pathogen *R. solanacearum*, and wood biochar was the highest in adsorption capacity, reaching up to 90.00%, and fixing the adsorbed *R. solanacearum* by 94.66%; 2) Biochars absorbed root exudates, which were used by probiotic T-5 as carbon source for growth, thus inhibiting the growth of *R. solanacearum*. 【Conclusion】As a carrier of probiotics, biochar, once applied together with probiotics can significantly decrease incidence of bacterial wilt by adsorbing root exudates probiotics relay as nutrient resources for growth and restricting the mobile ability of pathogen. The findings in this paper explain the mechanism of combined application of biochar and biocontrol bacteria controlling soil-borne tomato bacterial wilt and may serve as a theoretical basis for developing an environment-friendly, high efficiency and stable biocontrol strategy.

Key words: Soil-borne tomato bacterial wilt; Biochar carrier; Probiotic; Root exudates; Biological control

在经济作物种植区，由于化肥农药的长期过量投入和经济作物单一连作，导致土传病害频发，造成重大的经济损失。土传病害是高强度利用下土壤生物功能退化的重要表现之一^[1]。以土传青枯病为例，全国大部分地区均能检测到该病害的致病菌 (*Ralstonia solanacearum*，简称青枯菌)，且能够侵

害 200 多种重要的作物^[2]，被视为最严重的细菌性土传病害^[3]。根际是土传病原菌入侵植物的关键位点，病原菌通常利用寄主植物根际丰富的资源大量增殖，进而入侵作物根系^[4]。大量研究^[4-6]表明，土壤中丰富的微生物，如细菌、真菌、病毒以及一些小型的原生生物等能够有效抑制病害的发生，它们

通过竞争、寄生、捕食等多种方式构筑了抵御病原菌入侵植物根系的防线。有益菌芽孢杆菌因其较强的拮抗能力被广泛应用于土传青枯病的防治^[7]。但土壤环境复杂多变,温度、湿度、养分等均能够影响有益菌的生防效果,生产上施用单一有益菌的防控效果通常不稳定。有益菌在植物根际稳定定殖是其发挥生防作用的关键,为提高有益菌的生防效率,本研究提出为有益菌提供载体,提高其在根际的定殖能力。

生物质炭作为一种具有吸附性能的多孔性材料,在改善土壤结构、肥力^[8]的同时,可为微生物的生长提供营养,是有益菌载体的良好选择。富含碳的生物质在无氧或缺氧条件下经过高温裂解生产出一种高度芳香化、富含碳素的多孔固体颗粒物,其具有巨大的表面积和多孔结构,能够吸附根系分泌物^[9-10]。研究^[11-12]表明,生物质炭能够吸附或转移植物根系分泌物中低分子量物质,限制病原菌入侵。另一方面,生物质炭多孔结构能够为细菌的生长和增殖提供合适的栖息地和资源,有利于微生物在生物质炭孔径表面形成生物膜^[13],生物质炭还能够显著改变土壤微生物群落的结构和功能^[14]。有研究^[15]表明,生物质炭能够一定程度上去除连作土壤中的化感物质残留,降低芦苇根腐病的发生;桉树木和温室有机废料制成的生物质炭能够有效降低黄瓜猝倒病的发生^[16]。但以生物质炭作为有益菌载体的研究相对较少,其中的机制也有待进一步研究。本试验以番茄土传青枯病为病理模型,研究玉米秸秆、木块和稻壳3种不同原料制备的生物质炭为载体,对有益菌——解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 防控土传青枯病效果的影响,并从“空间”和“资源”转移的角度,探究生物质炭与有益菌联合抑菌的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:青枯菌,分离自南京市麒麟镇发病番茄根际强致病力的青枯菌 QL-Rs1115 (简称 RS)^[17],以及 QL-Rs1115 的红色荧光蛋白 (RFP) 标记菌株 QL-RFP (简称 RS-RFP)^[18]。有益菌,分离自发病区的健康番茄根际,具有较强抑菌能力的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-5^[19]。

供试生物质炭:裂解温度为 400℃,分别为南京勤丰秸秆科技有限公司的玉米秸秆生物质炭 (maize straw)、南京林业大学生物与环境学院环境工程系的木块 (松木) 生物质炭 (wood) 和稻壳生物质炭 (rice husk)。

1.2 生物质炭基础特性检测

利用 pH 计 (Sartorius PB-10, Goettingen, 德国) 对炭水比为 1:20 (w:v) 的生物质炭悬液测定 pH。利用比表面积及孔径分析仪 (V-Sorb 2008P, 金埃谱, 北京) 测定生物质炭的比表面积。利用亚甲基蓝吸附试验测定生物质炭物理吸附能力^[20]。

1.3 盆栽试验方法

Micro-Tom 番茄种子经表面消毒后,30℃催芽两天后播种至育苗盘中。三至四叶期番茄苗移栽至 6 孔大育苗盘中,每孔大约 600 g 土,试验设置 8 个处理:(1) 仅接种青枯菌 RS;(2) 接种青枯菌和有益菌 T-5;(3)~(5) 接种青枯菌和三种生物质炭;(6)~(8) 接种青枯菌和有益菌及三种生物质炭。青枯菌和有益菌接种悬液的制备方法:利用牛肉膏蛋白胨 (NA) 培养基活化青枯菌 RS 和有益菌 T-5,获得单菌落转接至 NA 液体培养基,30℃,170 r·min⁻¹ 培养 24 h。将新鲜菌液 6 000 r·min⁻¹ 常温离心 5 min,收集菌体,利用生理盐水 (9.5 g·kg⁻¹ NaCl) 重悬并调节 OD₆₀₀=1.0。有益菌与生物质炭混合悬液的制备方法:生物质炭与有益菌菌液混合,30℃、170 r·min⁻¹ 震荡 2 h,使二者充分混匀吸附。移栽一周后,按照不同处理以灌根方式接种有益菌、生物质炭及其混合悬液,其中有益菌的接种量为 10⁷ CFU·g⁻¹ 土,生物质炭的接种量为 10 g·kg⁻¹ (w:w, 生物质炭:土壤)。接种有益菌和生物质炭一周后接种青枯菌 RS 菌液 (10⁸ CFU·g⁻¹ 土)。每个处理 3 个 6 孔育苗盘 (3 个重复),共 18 株番茄。所有的盆钵定期随机移动位置,减少误差。温室的温度白天 22~32℃,夜间 20~25℃。5 周后番茄发病率趋于稳定,统计植株的发病情况。从各处理的每个重复中随机取一株健康植株,保存根际土壤样品,一部分用来提取土壤 DNA,定量青枯菌的数量;一部分土壤样品通过稀释涂布检测有益菌定殖的数量。

根际病原菌和拮抗菌数量的测定:利用 MO BIO 的强力土壤 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil[®] DNA Isolation Kit) 提取根际土壤的 DNA,检测 DNA 浓度和纯度。病原菌数量的测定采用荧光定量 PCR 的

方法, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara, 宝生物工程(大连)有限公司) 试剂盒。扩增引物为青枯菌的特异性引物, *FliC* F: 5'-GAACGCCAACGGTGCGAACT-3', *FliC* R: 5'-GAACGCCAA CGGTGCGAACT-3'^[21], 浓度为 10 pmol·μL⁻¹; 定量 PCR 反应体系为 20 μL: SYBR[®] Premix Ex Taq (2×) 10 μL, ROX reference Dye II (50×) 0.4 μL, 前端引物 0.8 μL, 末端引物 0.8 μL, DNA 模板 2.0 μL, ddH₂O 6 μL; 反应步骤为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 返回第二步, 40 个循环; 95℃ 30 s。扩增产物特异性表现为单一的熔融峰, 且 2% 凝胶电泳检测仅为一条条带。有益菌数量的测定采用选择性平板稀释涂布法: 称取根际土 3 g, 加 27 mL 无菌 ddH₂O, 37 °C、170 r·min⁻¹ 摇床中震荡 2 h, 梯度稀释涂布于通用的芽孢杆菌选择性培养基 (V8 培养基: V8 果蔬汁 326 mL·L⁻¹, 氯化钠 33.0 g·L⁻¹, 葡萄糖 0.8 g·L⁻¹, 调节 pH 至 6.0。倒平板前加入放线菌酮 45 mg·L⁻¹, 多黏菌素 22.5 mg·L⁻¹)^[22]。37 °C 培养 48 h 后, 统计平板上的菌落数。以不接种有益菌 T-5 的处理为对照, 接种有益菌后根际增加的芽孢杆菌来表征有益菌的定殖数量。

1.4 室内试验方法

生物质炭对青枯菌的吸附试验: 采用 Rivera-Utrilla 等^[23]报道的方法检测生物质炭对细菌吸附能力。将活化的 RS 菌液用生理盐水洗涤重悬, 调节 OD₆₀₀ 为 0.5 (~10⁸ CFU·mL⁻¹)。将 0.1 g 生物质炭和 10 mL RS 菌液混合, 放置于 30 °C、170 r·min⁻¹ 摇床中震荡 2 h, 取出静置 15 min, 吸取上清液进行稀释, 涂布于 SMSA 培养基 (semiselective medium for South Africa, 半选择性培养基)^[24], 以未经生物质炭处理的菌液为对照, 30 °C 培养 48 h 后计数。与对照相比, 生物质炭处理后青枯菌的相对减少量用来表征生物质炭吸附青枯菌的能力。

生物质炭对青枯菌的固持作用试验: 利用青枯菌对根系分泌物的趋化试验来检验青枯菌逃离生物质炭的能力, 从而评估生物质炭固持青枯菌的能力。采用 Rudrappa 等^[25]毛细管实验方法测定青枯菌的趋化能力: 将生物质炭和青枯菌菌液按照 1 : 100 (w : v, g : mL) 比例混合, 30 °C、170 r·min⁻¹ 震荡 2 h。1 mL 注射器吸取 100 μL 模拟根系分泌物培养基 (RE 培养基)^[26], 排净气泡; 用无菌枪头吸

取生物质炭与青枯菌混合悬浊液 100 μL, 将装有 RE 培养基的注射器针头从枪头尖端插入, 使两者中的液体形成连通, 以未经生物质炭处理的青枯菌菌液处理为对照, 30 °C 恒温静置 2 h 后, 对注射器内的液体进行稀释涂布, 30 °C 培养 48 h 后统计菌落数量。

生物质炭对根系分泌物的吸附试验: 将生物质炭和根系分泌物 (RE 培养基) 按照 1 : 100 (w : v) 混合, 30 °C、170 r·min⁻¹ 摇床中震荡 2 h, 悬液经无菌的 0.22 μm 水系滤膜过滤获得无菌悬液, 作为培养基接种至 96 孔细胞培养板中 (200 μL 体系) 用于培养青枯菌 RS (~10⁶ CFU·mL⁻¹), 以未经生物质炭处理的 RE 培养基为对照, 测定 36 h 群落的 OD₆₀₀ 值, 以各处理中青枯菌的生长间接表征生物质炭对根系分泌物的吸附能力。

有益菌利用根系分泌物对青枯菌的抑制作用试验: 含 196 μL 根系分泌物 (RE 培养基) 的 96 孔细胞培养板中接种 2 μL RS-RFP (~10⁸ CFU·mL⁻¹), 2 μL 有益菌 T-5 (~10⁷ CFU·mL⁻¹), 30 °C, 170 r·min⁻¹ 震荡培养, 每隔 6 h 用酶标仪 (SpectraMax M5, Molecular Devices, 美国) 测定群落的荧光值, 表征青枯菌的生长情况。30 μL 有益菌 T-5 悬液 (~10⁷ CFU·mL⁻¹) 接种至含 3 mL RE 培养基中, 30 °C, 170 r·min⁻¹ 震荡培养, 分别在 12、24、36 和 48 h 取培养物, 12 000 r·min⁻¹ 常温离心 5 min, 离心过滤得到无菌发酵液。利用平板对峙法检测该发酵液的抑菌能力。具体做法如下: 10 mL RS 悬液 (~10⁸ CFU·mL⁻¹) 与 100 mL 冷却至 50 °C 的 NA 半固体培养基混合均匀, 制备平板, 待平板冷却凝固后在中央打孔, 添加 50 μL 有益菌发酵物至孔中, 30 °C 培养基培养 24 h, 测定抑菌圈的大小。

1.5 数据处理

试验数据处理使用 IBM SPSS Statistics 22 统计分析, 采用 SigmaPlot 12.5 作图, 并使用邓肯 (Duncan's) 新复极差法检验差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 生物质炭的基础特性

3 种不同来源的生物质炭的 pH 均大于 8, 且差异显著 ($P < 0.001$, 表 1), 其中木块生物质炭 (wood) 的 pH 最低, 为 8.69。比表面积是影响生物质炭吸

附能力的重要物理指标之一。3 种生物质炭的比表面积存在较大的差异 ($P<0.001$, 表 1), 其中木块生物质炭的比表面积显著高于其他 2 种生物质炭, 达到 $395.9 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 玉米秸秆生物质炭的比表面积最

低。不同生物质炭对亚甲基蓝溶液的吸附能力存在较大的差异, 木块生物质炭在 24 h 的吸附总量达到 $116.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 显著高于其他两种原料的生物质炭 ($P<0.001$, 表 1)。

表 1 不同生物质炭的理化特性

Table 1 Physicochemical properties of biochar relative to sources

生物质炭 Biochar type	pH	比表面积 Specific surface area/ mm^2	吸附能力 Absorption capacity/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
玉米秸秆 Maize straw	$9.43 \pm 0.05\text{a}$	$132.5 \pm 5.88\text{c}$	$41.37 \pm 1.00\text{b}$
木块 Wood	$8.69 \pm 0.04\text{c}$	$395.9 \pm 9.74\text{a}$	$116.4 \pm 5.99\text{a}$
稻壳 Rice husk	$9.07 \pm 0.04\text{b}$	$167.5 \pm 11.92\text{b}$	$8.77 \pm 0.23\text{c}$

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$) Note: Different letters in the same column denote significant difference ($P<0.05$)

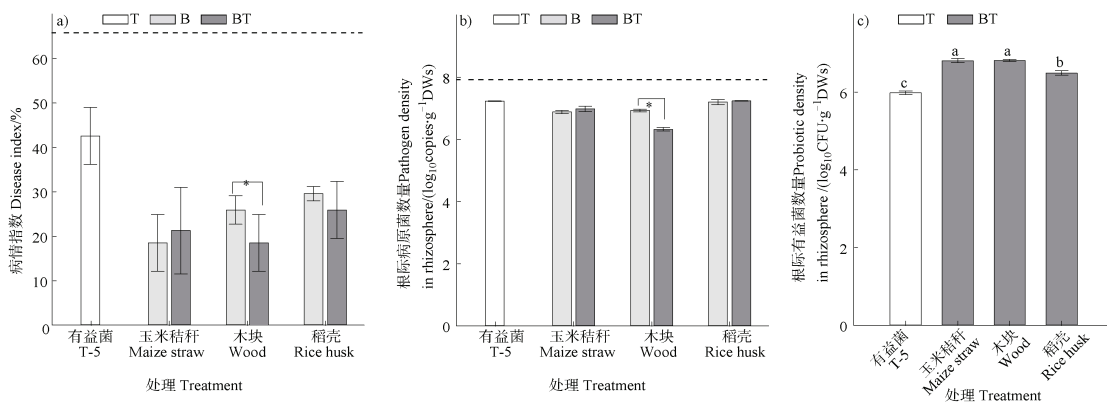
2.2 生物质炭载体与有益菌联合防控青枯病的效果

与对照相比, 有益菌或生物质炭单独处理均能够降低青枯病的病情指数 (有益菌单独: $P=0.004$; 生物质炭单独: $P<0.001$, 图 1a)。有益菌与生物质炭配合能够进一步提高有益菌防控青枯病效果, 与有益菌单独处理相比平均提高了 89.34%。不同生物质炭单独施用时对青枯病病情指数的影响差异显著 ($P=0.047$), 但与有益菌联合后处理间差异不显著。木块生物质炭与有益菌组合表现出协同效应, 显著提高了青枯病的防控效率, 与木块生物质炭单独处理相比提升了 18.61%。

进一步检测番茄根际青枯菌的数量, 结果表明,

与仅接种青枯菌的对照处理相比, 添加有益菌或 3 种不同来源生物质炭均能降低根际病原菌数量 (有益菌单独: $P<0.001$; 生物质炭单独: $P<0.001$, 图 1b)。不同生物质炭与有益菌联合时对根际病原菌数量的影响差异显著 ($P<0.001$, 图 1b)。其中木块生物质炭与有益菌联合效果最佳, 降低了 97.42% 的病原菌入侵根际。

生物质炭作为有益菌载体同时添加时, 能够显著提高有益菌在根际的定殖 ($P<0.001$, 图 1c)。与直接接种有益菌的处理相比, 玉米秸秆和木块生物质炭处理下有益菌定殖量分别提高了 5.73 倍和 5.71 倍。



注: 图 a 和图 b 中的虚线表示仅接种青枯菌的病情指数和根际病原菌数量; 图 a 和图 b 中*: $P<0.05$; 图 c 中不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); 图例中 T: 接种有益菌, B: 接种生物质炭, BT: 接种生物质炭和有益菌。下同。Note: In (a) and (b), dashed lines represent disease index and pathogen density in the control treatment inoculated with *Ralstonia solanacearum* only, and * denotes $P<0.05$; and in (c), different letters denote significant difference ($P<0.05$); T stands for inoculation of probiotic T-5, B for application of biochar and BT for application of biochar and inoculation of probiotic T-5 together. The same below.

图 1 不同生物质炭联合有益菌处理对青枯病病情指数 (a)、根际青枯菌 (b) 和有益菌 (c) 定殖的影响

Fig. 1 Effect of combined application of biochar and probiotics on disease index (a) and population of pathogens (b) and probiotic colonization (c) in rhizosphere soil relative to kind of the biochar

2.3 生物质炭载体与有益菌联合抑制青枯菌的机制

利用室内模拟试验探究生物质炭联合有益菌防控青枯病的潜在机制。首先检测不同生物质炭对青枯菌的直接吸附作用，涂布计数结果表明，不同生物质炭对青枯菌的吸附效率平均达到 80.42%，处理之间差异显著 ($P<0.001$, 图 2a)。其中，木块生物质炭的效果显著优于玉米秸秆和稻壳生物质炭，对青枯菌的吸

附效果最佳，能够吸附 88.45% 的青枯菌 (图 2a)。

利用趋化试验检测不同生物质炭对青枯菌的固持作用。不同生物质炭的固持效果差异明显，由高到低依次为：木块生物质炭、玉米秸秆生物质炭、稻壳生物质炭 ($P<0.001$, 图 2b)。木块生物质炭的固持效果显著高于其他两种生物质炭，阻止 94.66% 的青枯菌逃离生物质炭。

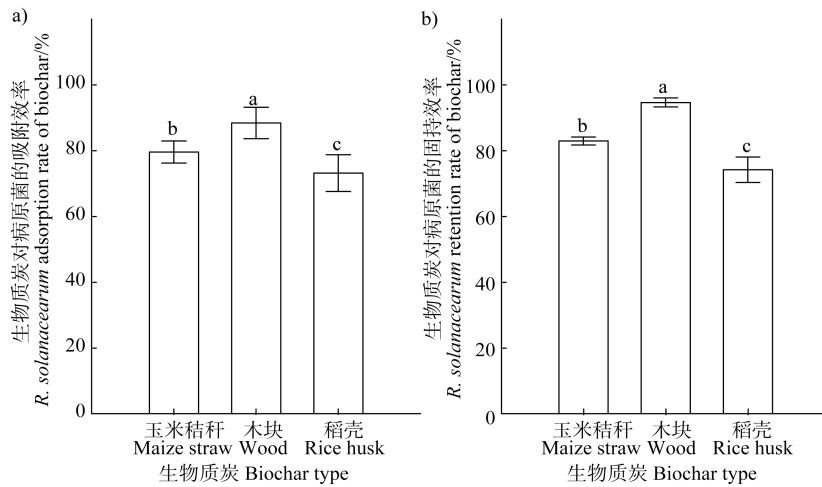


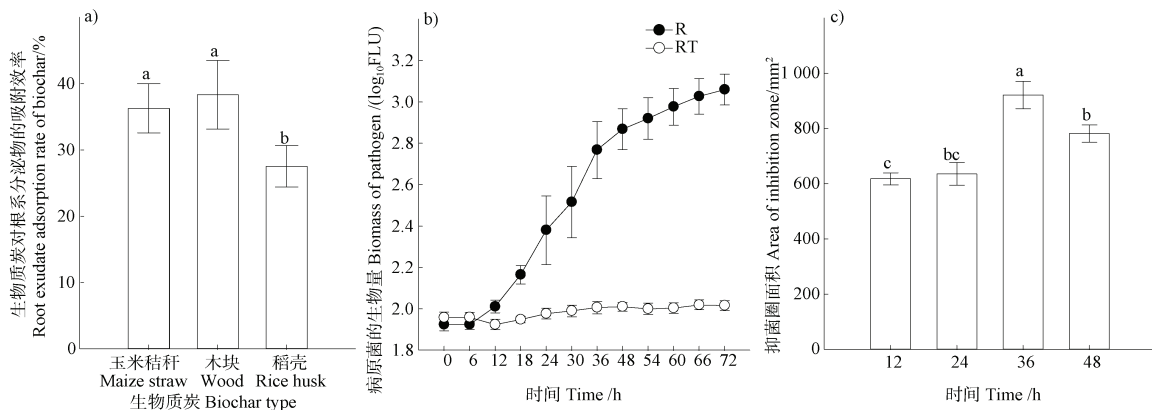
图 2 不同生物质炭对青枯菌的吸附 (a) 和固持 (b) 能力

Fig. 2 Biochar's *R. solanacearum* adsorption (a) and the retention (b) capacities relative to kind of the biochar

利用不同生物质炭吸附根系分泌物，然后检测青枯菌利用这些根系分泌物的能力，以青枯菌的生长情况间接表征生物质炭对根系分泌物的吸附能力。青枯菌在经生物质炭吸附后的根系分泌物中的生长明显受到抑制，说明根系分泌物中部分有效营养物质被生物质炭吸附，营养供应不足导致青枯菌生长受阻。3 种生物质炭中，木块生物质炭和玉米

秸秆生物质炭对根系分泌物的吸附显著高于稻壳生物质炭 ($P<0.001$, 图 3a)。

以上研究说明生物质炭能够有效吸附根系分泌物，进一步分别利用共培养体系和平板对峙的方法，评估有益菌利用根系分泌物对青枯菌的营养和拮抗竞争作用。青枯菌单独培养时生长随时间呈现“S”形，当与有益菌 T-5 共培养时，青枯菌的生长受到明显抑



注：图 b 中 R：仅接种青枯菌，RT：接种青枯菌和有益菌；图 b 共培养，图 c 对峙培养。 Note: In (b) R means inoculation of *R. solanacearum* only; and RT, inoculation of both *R. solanacearum* and probiotic T-5; (b) for co-culture and (c) for confrontation culture.

图 3 不同生物质炭对根系分泌物的吸附能力 (a) 及有益菌利用根系分泌物对青枯菌的抑制作用 (b, c)

Fig. 3 Biochar's root exudate adsorption rate (a) and effect of probiotics utilizing root exudates and inhibiting *R. solanacearum* (b, c)

制(图 3b)且抑菌效果稳定。拮抗竞争的结果表明有益菌以根系分泌物为营养时,能够显著抑制青枯菌的生长,且抑菌效果随着时间逐渐增强,在 36 h 有益菌产生的抑菌物质活性最高,抑菌圈最大(图 3c)。

3 讨 论

3.1 生物质炭载体与有益菌联合能够有效抑制病原青枯菌入侵

生物质炭是集肥料、改良剂和吸附剂于一体的多孔性材料,在土传病害的防控中表现出巨大的潜力。本研究提出以生物质炭作为有益菌的载体,充分发挥生物质炭的物理吸附作用和有益菌高效抑菌的优势,减少根际病原菌可利用的资源,增强有益菌根际定殖能力,最终提高有益菌的防控效果。以 3 种不同原料制备的生物质炭为载体,利用盆栽试验探究生物质炭对有益菌防控番茄土传青枯病效果的影响。结果发现,生物质炭载体与有益菌联合能够有效降低青枯病的发病指数和根际病原菌数量(图 1a 和图 1b)。不同生物质炭作为载体对有益菌生防效果的增强作用存在差异,其中木块生物质炭的效果最好。这可能与木块生物质炭具有较大的比表面积和物理吸附能力有关。三种生物质炭中,木块生物质炭的比表面积达到 396.9 mm^2 ,吸附能力达到了 $116.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,显著优于其他两种生物质炭(表 1)。研究^[27-28]表明,生物质炭的物理性质(表面面积和孔结构)和化学性质(表面化学性质)共同决定生物质炭的吸附能力,而生物质炭的吸附能力是其发挥作用的关键。所以,木块生物质炭的大比表面积和强吸附性能一定程度解释木块生物质炭载体联合有益菌对土传青枯病的防控效果最佳。与单独接种有益菌相比,本研究发现,以不同生物质炭为有益菌的接种载体,能够显著提高有益菌在根际的定殖能力(图 1c)。生物质炭的施用可增加土壤的碳储量^[8]、土壤的肥力和质量。大量研究^[29-30]表明,生物质炭能够通过改变土壤微生物的生境或直接影响微生物的代谢调控根际微生物群落的结构和功能。生物质炭丰富的孔隙结构和巨大的表面积能够为土壤微生物提供庇护所^[31];生物质炭颗粒上附着的营养物质可为微生物的生长提供养分^[32];生物质炭通过改善微生物生长的土壤特性(包括通气条件、水

含量和 pH)来改变微生物栖息地^[31]等。

3.2 生物质炭载体与有益菌联合抑制病原青枯菌可能的机制

本研究发现,生物质炭能够直接吸附青枯菌,吸附效率达到 88.45%(图 2a)。但青枯菌处于动态过程,一旦生物质炭内部的营养物质消耗殆尽或外界出现信号物质的诱导,青枯菌随时会逃逸出生物质炭。所以生物质炭不仅需要有效吸附青枯菌,还需有较强的固持能力。前人研究很少同时评估生物质炭的吸附和固持能力,本试验利用离体的趋化性试验,模拟了生物质炭对青枯菌的固持作用,结果发现生物质炭能够有效阻止青枯菌的逃逸,其中生物质炭的固持效果达到 94.66%(图 2b)。生物质炭对病原青枯菌的吸附作用除了与其强吸附能力有关,还可能与生物质炭吸附根系分泌物资源、诱导青枯菌进入生物质炭有关。有研究^[33]表明,生物质炭能够通过吸附根系分泌物而驱动病原菌的趋化作用。植物根系分泌的糖、氨基酸和有机酸等物质是有益菌和病原青枯菌根际营养竞争的核心^[9]。除了直接吸附、固持病原菌,本研究还发现 3 种生物质炭对根系分泌物也有一定的吸附作用(图 3a)。通常,青枯菌和有益菌之间争夺资源的“战场”在根际,但随着生物质炭对根系分泌物、青枯菌和有益菌的吸附作用,“主战场”随之转移至生物质炭内部。前期研究^[34]也发现多种不同资源存在时,能够同时促进有益菌 T-5 的生长和产拮抗物质的能力。共培养和对峙试验均发现,在模拟根系分泌物中,有益菌能够有效利用根系分泌物,抑制青枯菌的生长(图 3b,图 3c)。说明有益菌以生物质炭为载体,能够高效利用根系分泌物资源,产生拮抗物质抑制病原青枯菌的生长。

基于现有的结果,本研究提出生物质炭作为有益菌载体,增强有益菌抵御病原青枯菌入侵番茄根际的潜在机制,如图 4 所示:首先,生物质炭吸附根系分泌物和青枯菌,诱导青枯菌离开根表,进入生物质炭孔隙中(过程 1);然后,生物质炭内部青枯菌因生物质炭的强吸附能力,固持了青枯菌,降低其逃逸(过程 2);最后,生物质炭吸附的有益菌通过竞争根系分泌物资源,减少病原菌资源的可利用性,同时产生大量的抑菌物质,抑制病原菌的生长(过程 3)。因为青枯菌与有益菌的互作“战场”转

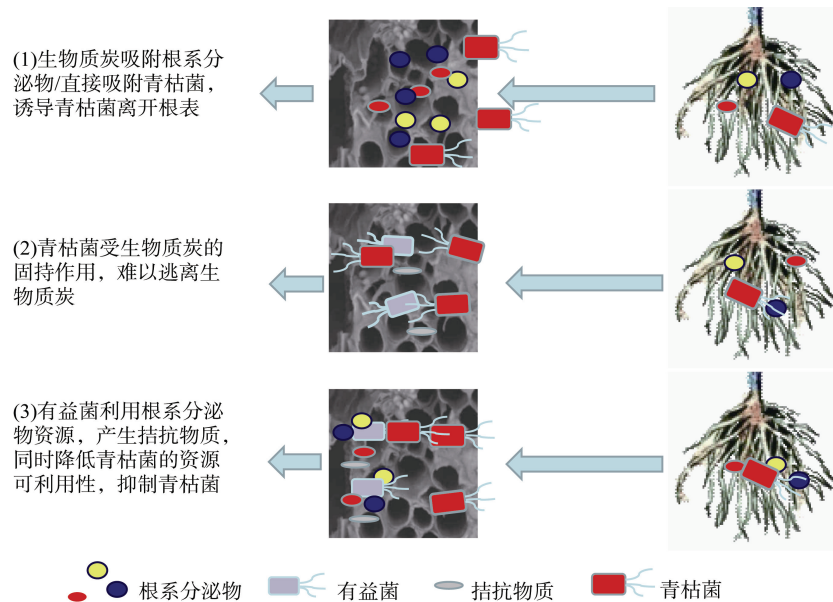


图 4 有益菌-生物质炭复合抑制青枯菌入侵番茄根系的作用机制

Fig. 4 Mechanism of probiotics- biochar on inhibiting *R. solanacearum* from invading tomato roots

移至生物质炭内部，极大减少直接侵害植物的病原菌数量。本研究中生物质炭虽然不能去除根际土壤中的病原青枯菌，但结合有益菌的抑菌作用，能够有效降低青枯病的发生。下阶段将会进一步从植物根际原位探究生物质炭载体与有益菌联合抑制青枯菌的机制。

4 结 论

不同原料制备的生物质炭作为有益菌的载体，能够有效提高有益菌对番茄土传青枯病的防控效果，青枯病的发病率和根际病原菌数量均有不同程度的下降，其中比表面积大、吸附能力强的木块生物质炭的增效作用最强。进一步研究其中的机制，发现生物质炭作为有益菌的载体能够有效提高有益菌在根际的定殖，同时能够有效吸附和固持病原菌，对根系分泌物也有一定的吸附作用。说明生物质炭可能通过“营养”和“空间”转移作用提高有益菌的生防效率。

参考文献 (References)

- [1] Cai Z C, Huang X Q. Soil-borne pathogens should not be ignored by soil science[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (2): 305—310. [蔡祖聪, 黄新琦. 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (2): 305—310.]
- [2] Jiang G, Wei Z, Xu J, et al. Bacterial wilt in China: History, current status, and future perspectives[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549.
- [3] Mansfield J, Genin S, Magori S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13 (6): 614—629.
- [4] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17 (8): 478—486.
- [5] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332 (6033): 1097—1100.
- [6] Wang X F, Wei Z, Li M, et al. Parasites and competitors suppress bacterial pathogen synergistically due to evolutionary trade-offs[J]. *Evolution*, 2017, 71 (3): 733—746.
- [7] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16 (3): 115—125.
- [8] Bao J P, Yuan G S, Dong F Y, et al. Effects of biochar application and straw returning on organic carbon fractionations and microbial activities in a red soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (3): 721—729. [包建平, 袁根生, 董方圆, 等. 生物质炭与秸秆施用对红壤有机碳组分和微生物活性的影响[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (3): 721—729.]
- [9] Bais H P, Prithiviraj B, Jha A K, et al. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots[J]. *Nature*, 2005, 434 (7030): 217—221.
- [10] Callaway R M, Aschehoug E T. Invasive plants versus their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion[J]. *Science*, 2000, 290 (5491): 521—523.
- [11] Gu Y, Hou Y G, Huang D P, et al. Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root

- exudate adsorption[J]. *Plant and Soil*, 2017, 415 (1-2): 269—281.
- [12] Masiello C A, Chen Y, Gao X D, et al. Biochar and microbial signaling: Production conditions determine effects on microbial communication[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (20): 11496—11503.
- [13] Gibert O, Lefevre B, Fernández M, et al. Characterising biofilm development on granular activated carbon used for drinking water production[J]. *Water Research*, 2013, 47 (3): 1101—1110.
- [14] Kolton M, Graber E R, Tsehansky L, et al. Biochar-stimulated plant performance is strongly linked to microbial diversity and metabolic potential in the rhizosphere[J]. *New Phytologist*, 2017, 213 (3): 1393—1404.
- [15] Elmer W H, Pignatello J J. Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of *Asparagus* in replant soils[J]. *Plant Disease*, 2011, 95 (8): 960—966.
- [16] Jaiswal A K, Elad Y, Graber E R, et al. Rhizoctonia solani suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 69: 110—118.
- [17] Wei Z, Yang X M, Yin S X, et al. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 48 (2): 152—159.
- [18] Tan S Y, Gu Y, Yang C L, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* t-5 may prevent *Ralstonia solanacearum* infection through competitive exclusion[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52 (3): 341—351.
- [19] Tan S, 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 Protection*, 2013, 43: 134—140.
- [20] Xu R K, Zhao A Z, Xiao S C, et al. Adsorption of methylene blue from water by the biochars generated from crop residues[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2012, 33 (1): 142—146. [徐仁扣, 赵安珍, 肖双成, 等. 农作物残体制备的生物质炭对水中亚甲基蓝的吸附作用[J]. *环境科学*, 2012, 33 (1): 142—146.]
- [21] Schönfeld J, Heuer H, van Elsas J D, et al. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *flic* fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (12): 7248—7256.
- [22] Kinsella K, Schulthess C P, Morris T F, et al. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41 (2): 374—379.
- [23] Rivera-Utrilla J, Bautista-Toledo I, Ferro-García M A, et al. Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, 76 (12): 1209—1215.
- [24] Elphinstone J, Hennessy J, Wilson J, et al. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts[J]. *EPPO Bulletin*, 1996, 26 (3/4): 663—678.
- [25] Rudrappa T, Czymmek K J, Paré P W, et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148 (3): 1547—1556.
- [26] Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (10): 3697—3708.
- [27] Fan Y Z, Wang B Z. Surface chemistry of activated carbon[J]. *Coal Conversion*, 2000, 23 (4): 26—30. [范延臻, 王宝贞. 活性炭表面化学[J]. *煤炭转化*, 2000, 23 (4): 26—30.]
- [28] Meng G H, Li A M, Zhang Q X. Studies on the oxygen-containing groups of activated carbon and their effects on the adsorption character[J]. *Ion Exchange and Adsorption*, 2007, 23 (1): 88—94. [孟冠华, 李爱民, 张全兴. 活性炭的表面含氧官能团及其对吸附影响的研究进展[J]. *离子交换与吸附*, 2007, 23 (1): 88—94.]
- [29] Zhu X M, Chen B L, Zhu L Z, et al. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 227: 98—115.
- [30] Ma B B, Huang R L, Zhang N, et al. Effect of straw-derived biochar on molecular ecological network between bacterial and fungal communities in rhizosphere soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (4): 964—974. [马泊泊, 黄瑞林, 张娜, 等. 秸秆生物质炭对根际土壤细菌-真菌群落分子生态网络的影响[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (4): 964—974.]
- [31] Quilliam R S, Glanville H C, Wade S C, et al. Life in the 'charosphere' - Does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 287—293.
- [32] Joseph S, Graber E R, Chia C, et al. Shifting paradigms: Development of high-efficiency biochar fertilizers based on nano-structures and soluble components[J]. *Carbon Management*, 2013, 4 (3): 323—343.
- [33] Gu Y, Hou Y, Huang D, et al. Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root exudate adsorption[J]. *Plant and Soil*, 2017, 415 (1/2): 269—281.
- [34] Yang C L, Dong Y, Friman V P, et al. Carbon resource richness shapes bacterial competitive interactions by alleviating growth-antibiosis trade-off[J]. *Functional Ecology*, 2019, 33 (5): 868—875.

(责任编辑: 陈荣府)