

张 猛, 王 琼, 冯发运, 等. 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌防治西瓜枯萎病[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1308-1315.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.006

## 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌防治西瓜枯萎病

张 猛<sup>1</sup>, 王 琼<sup>1</sup>, 冯发运<sup>1</sup>, 李 勇<sup>1</sup>, 袁建军<sup>2</sup>, 余向阳<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014; 2. 泉州师范学院海洋与食品学院/近海资源生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 以稻壳为材料高温裂解制备生物炭, 利用其优良吸附特性搭载特基拉芽孢杆菌防治西瓜苗期枯萎病。结果表明, 500 ℃裂解温度下制备的稻壳生物炭的吸附性能最佳, 在菌液中 2 h, 每 1 g 载菌量最大为  $6.77 \times 10^{10}$  个, 且能显著延长特基拉芽孢杆菌在土壤中的存活时间。经稻壳生物炭吸附搭载后, 特基拉芽孢杆菌对西瓜枯萎病的防效为 83.1%, 显著高于直接施用菌液的防效 (72.5%)。载特基拉芽孢杆菌稻壳生物炭施入后, 土壤中过氧化氢酶、脲酶、纤维素酶、蔗糖酶及脱氢酶活性分别为 4.40  $\mu\text{mol/g}$ 、1.43  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ 、3.05  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ 、3.36  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  和 33.72  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 较对照显著升高, 并促进西瓜幼苗生物量增长 54.4% 左右。本研究结果对利用生物炭搭载生防微生物防治作物土传病具有一定指导意义。

**关键词:** 稻壳生物炭; 特基拉芽孢杆菌; 吸附搭载; 西瓜枯萎病

**中图分类号:** S436.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1308-08

## Control effects of *Bacillus tequilensis* boarded by rice husk-derived biochar on watermelon wilt disease

ZHANG Meng<sup>1</sup>, WANG Qiong<sup>1</sup>, FENG Fa-yun<sup>1</sup>, LI Yong<sup>1</sup>, YUAN Jian-jun<sup>2</sup>, YU Xiang-yang<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China; 2. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University/Inshore Resources Biotechnology Key Laboratory of Fujian Advanced Education, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** The control effects on watermelon wilt diseases of the *Bacillus tequilensis* boarded by the biochar, which pyrolyzed and carbonized from rice husk at high temperature, were studied. The results showed that absorption properties of the rice husk-derived biochar prepared at 500 ℃ were the best. When soaked in bacteria solution for two hours, the maximum number of bacteria adsorbed by one gram of the biochar was  $6.77 \times 10^{10}$ . Moreover, the survival time of the *B. tequilensis* boarded by the biochar in soil was significantly increased. The control effect of the *B. tequilensis* adsorbed and boarded by the biochar on watermelon wilt disease was 83.1%, which was significantly higher than that of *B. tequilensis* without being treated with biochar. Meanwhile, the biomass of watermelon seedling was increased by 54.4% under the treatment of the *B. tequilensis* adsorbed and boarded by the biochar and the activities of catalase, urease, cellulase, sucrase and dehydrogenase were 4.40  $\mu\text{mol/g}$ , 1.43  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 3.05  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 3.36  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  and 33.72  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , respectively. The activities of the above soil enzymes in the treatment of *B. tequilensis* boarded by the biochar were significantly higher than those in the control. These results of this study have certain guiding significance for the use of biocontrol microorganism ad-

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(18)3052]; 国家自然科学基金项目 (31401779); 泉州市高层次人才创新创业项目 (2017Z034); 福建省高校产学研合作项目 (2019N5011)

作者简介: 张 猛 (1982-), 男, 山东泰安人, 博士, 副研究员, 研究方向为作物土传病害生物防治。(Tel) 025-84390396; (E-mail) z320m320@163.com

通讯作者: 余向阳, (E-mail) yu981190@hotmail.com

ment of the *B. tequilensis* adsorbed and boarded by the biochar and the activities of catalase, urease, cellulase, sucrase and dehydrogenase were 4.40  $\mu\text{mol/g}$ , 1.43  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 3.05  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 3.36  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  and 33.72  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , respectively. The activities of the above soil enzymes in the treatment of *B. tequilensis* boarded by the biochar were significantly higher than those in the control. These results of this study have certain guiding significance for the use of biocontrol microorganism ad-

sorbed and boarded by the biochar to control soil-borne crop diseases.

**Key words:** rice husk-derived biochar; *Bacillus tequilensis*; adsorbed and boarded; watermelon wilt disease

西瓜枯萎病是西瓜连作障碍的主要病害之一,其病原菌是尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)。随着西瓜逐年连作和重茬,西瓜枯萎病发生日趋严重,造成西瓜大量减产,一般病田减产30%~40%,重病田则可减产80%以上甚至绝产,在世界西瓜各大产区造成严重的经济损失<sup>[1-4]</sup>。目前,防治西瓜枯萎病主要采用抗病品种、嫁接、轮作以及化学防治等方式,但是这些措施面临着西瓜遗传基础狭窄、品种资源匮乏、品质抗性丧失、种子携菌、品质易受影响、病原菌抗药性增强、农药残留等问题<sup>[5-6]</sup>。当前,随着人们对优质、安全农产品的强烈需求以及环境保护的日益关注,见效快、无污染、环境友好的生物防治措施成为西瓜枯萎病防控的首选。

特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)是一类广谱拮抗菌,研究发现其能够抑制黑曲霉、毛霉菌<sup>[7]</sup>,桑葚菌核病菌<sup>[8]</sup>,小麦赤霉病菌<sup>[9]</sup>,烟草黑胫病菌<sup>[10]</sup>,大豆炭疽病菌<sup>[11]</sup>,桃褐腐病菌<sup>[12]</sup>,番茄枯萎病菌<sup>[13]</sup>,西瓜枯萎病菌<sup>[14]</sup>。可见,特基拉芽孢杆菌作为一类广谱的生防菌在农业生产上具有广阔的应用前景。

生物炭是生物质在限氧条件下经高温裂解产生的一类高度富炭的难溶性固态物质<sup>[15-16]</sup>,具有比表面积大、吸附能力强、成本低、原料多等优点<sup>[17-21]</sup>,在土壤改良和农业生产领域早已得到广泛应用<sup>[22]</sup>。近年来也被应用于作物土传病害的防治中,研究结果表明在土壤中添加适量的生物炭能降低由土壤病原菌引起的芦笋、枫树、橡树的土传病害<sup>[23-24]</sup>。但是也有研究发现,添加高剂量生物炭对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的黄瓜立枯病无影响甚至促进病害的发生<sup>[25]</sup>。鉴于生物炭在土传病害防治中具有两面性,本研究拟利用稻壳生物炭的优良吸附性能搭载生防特基拉芽孢杆菌,直接应用到西瓜根际防治枯萎病害。研究结果将解决土传病害生物防治中生防微生物难以在作物根际定殖、存活的难题,为生物炭-植物内生防细菌协同防控西瓜连作病害的机制提供理论依据,为优质、安全农产品的生产提供保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.

sp. *niveum*)、特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis* WM31)由江苏省农业科学院产地环境研究室保存,特基拉芽孢杆菌对西瓜枯萎病菌具有优良的拮抗作用<sup>[14]</sup>;稻壳取自江苏省农业科学院溧水实验基地;西瓜品种为苏创1号,由淮安市农业科学院蔬菜研究发展中心提供;菌株培养基:马铃薯蔗糖培养基(PDB)、Luria-Bertani培养基(LB)、绿豆汤培养基(MB)。

### 1.2 稻壳生物炭的制备

将干燥的稻壳清洗、烘干后,置于真空管式炉(SG-GL 1100K,中国科学院上海光学精密机械研究所产品)中,对炉管进行抽真空限氧(初始气压值-1.0 Pa),以10℃/min升温至炭化温度(300℃、400℃、500℃),恒温炭化60 min,在炭化过程中始终保持真空管中负压状态,制备的稻壳生物炭冷却,分别标记为D300、D400、D500,过40目筛备用。

### 1.3 稻壳生物炭孔径结构分析

稻壳生物炭样品孔径结构利用美国麦克公司TriStar II Plus全自动三站式比表面积和孔隙度分析仪测定,以氮气为吸附介质,在77 K下和相对压力( $P/P_0$ )为 $10^{-6}$ ~ $10^{-1}$ 时进行氮吸附测定。测试前样品在200℃下脱气12 h。采用BET法计算生物炭总比表面积,按照Horvath-Kawazoe(H-K)方程、BJH方程分别计算生物炭微孔(VH-K)与中孔容积(VBJH),以上二者之和计为总孔容( $V_{total}$ ),用DFT方程表征生物炭全孔孔径分布。

### 1.4 稻壳生物炭吸附生防菌生物量的测定

分别称取稻壳生物炭(D300、D400、D500)0.1 g于100 ml的敞口锥形瓶中,加入pH值为7.0的特基拉芽孢杆菌溶液35 ml(菌含量约 $1 \times 10^{10}$  CFU/ml)。锥形瓶于恒温振荡器(30℃,振速为120 r/min)中进行振荡吸附。设置不同时间点:2 h、10 h、21 h,每个时间点取出相对应的锥形瓶测定稻壳生物炭所吸附的微生物量,测定方法参考桑军强等<sup>[26]</sup>的方法。

### 1.5 稻壳生物炭吸附的生防菌在土壤中的存活时间

为了排除土壤中杂菌的干扰,首先将特基拉芽孢杆菌进行抗生素标记。标记方法及特基拉芽孢杆菌

发酵液参照文献[14],得到发酵液经6 000 r/min离心去除培养液,用无菌生理盐水重悬后稀释至 $1 \times 10^9$  CFU/ml备用。载菌稻壳生物炭的制备:取 100 g 的 500 °C 下制得的稻壳生物炭(D500)加入到 1 L 三角瓶中,加入上述细菌悬浮液 500 ml 放置在摇床上 50 r/min 吸附 2 h,混合液过 200 目筛,将载菌生物炭放置在吸水纸上置于超净工作台中心晾 30 min,使其含水量控制在 20% 左右,测定其吸附芽孢杆菌量约 $1 \times 10^9$  CFU/g,装入灭菌自封袋备用。设置 2 个处理,A 处理:取大田土壤 10 kg,加入 200 g 载菌稻壳生物炭,混匀后放置到室温密封保存;B 处理:取 200 ml 特基拉芽孢杆菌菌悬液加入 10 kg 大田土壤中,混匀室温密封保存。分别于处理后 7 d、14 d、21 d、51 d、81 d、120 d 取处理土壤 50 g,加入无菌水定容至 1 000 ml,放入摇床 30 °C、200 r/min 震荡 20 min。取 10 ml 溶液到 100 ml 容量瓶中,定容到 100 ml,再 10 倍稀释 5 次后,取 100  $\mu$ l 在含有利福平 100  $\mu$ g/ml 的 LB 平板上涂板,30 °C 倒置培养 12 h,统计菌落数,设置 3 次重复。每 1 g 土壤中的活菌数= $(a \times n \times v_1) / (v_2 \times m)$ ,公式中  $a$ :平板菌落计数平均值, $n$ :稀释倍数, $v_1$ :初始稀释体积, $v_2$ :涂平板的稀释液体积, $m$ :取样质量。

### 1.6 盆栽试验

盆栽试验在江苏省农业科学院日光温室内进行。含有西瓜枯萎病菌的土壤(病菌土壤)制备、特基拉芽孢杆菌菌液制备以及西瓜幼苗的培养参照文献[14]。载生防菌稻壳生物炭的制备:参照方法 1.5 的方法。试验设 2 组处理,即拮抗特基拉芽孢杆菌液( $1 \times 10^9$  CFU/ml)处理(每杯含有西瓜枯萎病菌的土壤中加入 6 ml 特基拉芽孢杆菌菌液);载菌稻壳生物炭处理:每杯含有西瓜枯萎病菌的土壤中分别加入 3 g、6 g 载菌稻壳生物炭;西瓜苗移栽后

不作任何处理的为对照组,每处理 15 株西瓜苗,3 次重复。所有处理置于光照培养箱中继续培养(光照度 20 000 lx,光周期 16 h(光照)/8 h(黑暗),相对湿度 75%~100%),21 d 后按照南宇航等[27]的分级标准调查西瓜苗发病情况,病情指数与防治效果计算方法参照文献[14]。

### 1.7 稻壳生物炭吸附的生防菌对土壤酶活性的影响

取大田土 10 kg,按照质量百分比 2% 的比例加入载菌稻壳生物炭,混匀后放置到室温密封保存,30 d 后,取 10 g 土样,测定土壤中纤维素酶、中性蛋白酶、蔗糖酶、脲酶、过氧化氢酶、脱氢酶活性,活性测定方法参照苏州科铭生物技术有限公司土壤酶测定试剂盒说明书[28]。

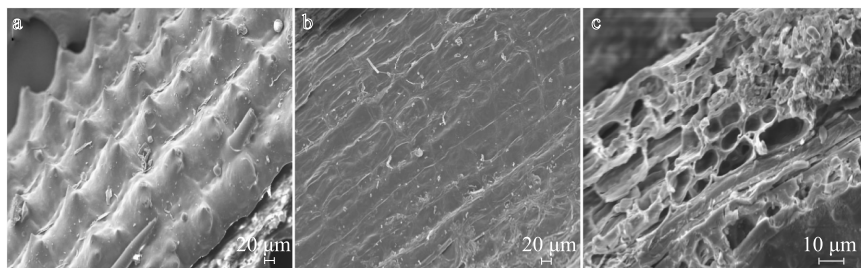
### 1.8 数据分析

采用 SPSS16.0 统计软件对处理间差异显著性进行比较,数据表示为平均数 $\pm$ 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物炭的结构吸附特性

使用扫描电镜对稻壳生物炭的超微结构进行观察,发现稻壳生物炭外表面具有芒刺,内表面平滑,横断面呈不规则蜂窝状(图 1)。稻壳生物炭的 BET 比表面积、微孔表面积、外表面积、总孔容及平均孔径测定结果见表 1,随着温度的升高稻壳生物炭的 BET 比表面积、微孔表面积、外表面积、总孔容等数值迅速增大,但是平均孔径则减小。由于生物炭的吸附性主要与 BET 比表面积、微孔表面积、外表面积、总孔容等参数相关,因此 500 °C 制备的稻壳生物炭的吸附性能最佳。



a: 外表面; b: 内表面; c: 横断面。

图 1 稻壳生物炭的微观结构

Fig.1 Microscopic observation of rice husk-derived biochar

表 1 稻壳生物炭吸附特性分析

Table 1 Analysis of adsorption characteristics of rice husk-derived biochar

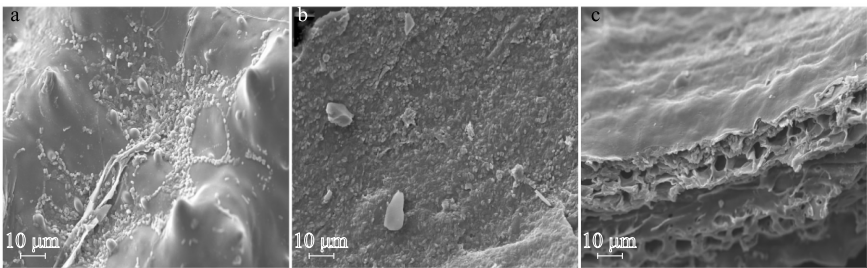
生物炭	BET 比表面积( $\text{m}^2/\text{g}$ )	微孔表面积( $\text{m}^2/\text{g}$ )	外表面积( $\text{m}^2/\text{g}$ )	总孔容( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	平均孔径(nm)
D300	6.213	6.157	0.057	0.024	15.300
D400	12.079	11.706	0.374	0.032	10.530
D500	366.475	27.335	339.140	0.064	8.196

D300、D400、D500 分别表示炭化温度 300 ℃、400 ℃、500 ℃下制备的稻壳生物炭。

2.2 稻壳生物炭对特基拉芽孢杆菌的吸附

扫描电镜观察结果表明,稻壳生物炭吸附的特基拉芽孢杆菌主要集中外表面芒刺底部凹槽部分、内表面以及横断面的蜂窝孔洞中,且吸附量较大(图 2)。稻壳生物炭对特基拉芽孢杆菌吸附试验结果表明,在 2 h 时,D500 对特基拉芽孢杆菌的吸附量最大且单位吸附量为 1 g  $6.76\times10^{10}$  个,显著高于 D300 和 D400 的单位质量吸附量(分别为 1 g  $2.37\times$

$10^{10}$ 和 $2.26\times10^{10}$ 个)。稻壳生物炭在菌液中随着吸附时间的延长,单位质量稻壳生物炭吸附菌量迅速下降且各处理间差异不明显。吸附 10 h 时,D300、D400 和 D500 的单位质量吸菌量分别为 1 g  $1.77\times10^{10}$ 、 $1.69\times10^{10}$ 和  $1.70\times10^{10}$ 个;吸附 21 h 时,D300、D400 和 D500 的单位质量吸菌量分别为每 1 g  $8.51\times10^9$ 、 $9.90\times10^9$ 和 $7.98\times10^9$ 个(图 3)。



a:外表面;b:内表面;c:横断面。  
图 2 稻壳生物炭吸附特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 后微观观察

Fig.2 Microscopic observation of *Bacillus tequilensis* adsorbed by rice husk-derived biochar

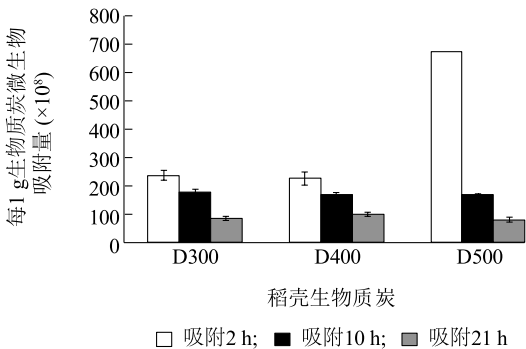


图 3 不同稻壳生物炭对特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 吸附量  
Fig.3 Adsorption capacity of different rice husk-derived biochars to *B. tequilensis*

2.3 稻壳生物炭吸附的特基拉芽孢杆菌在土壤中存活时间

如图 4 所示,接种特基拉芽孢杆菌发酵液处理 7 d 时检测活菌数为 $6.72\times10^9$  CFU/g,但是随着时

间的延长,活菌数迅速下降,到 120 d 时活菌数仅为  $2.5\times10^8$  CFU/g;而稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌处理的活菌数则是一个由缓慢释放到数量迅速增长再缓慢下降的过程,在处理 7 d 时检测活菌数只有 $3.03\times10^9$  CFU/g,但是处理 21 d 时活菌数达到峰值 $9.83\times10^9$  CFU/g,之后活菌数缓慢下降。到处理 120 d 时,活菌数仍有 $2.98\times10^9$  CFU/g,以上结果表明经稻壳生物炭固定搭载后,特基拉芽孢杆菌在土壤中的存活数量及存活时间显著增加。

2.4 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌对西瓜枯萎病的防治

试验结果表明,特基拉芽孢杆菌菌液及载特基拉芽孢杆菌稻壳生物炭处理均能够有效防止西瓜枯萎病的发生,与对照相比发病率显著下降 84.8%~92.7%。在同等数量特基拉芽孢杆菌处理下,载特基拉芽孢杆菌生物炭处理对西瓜枯萎病菌相对防效

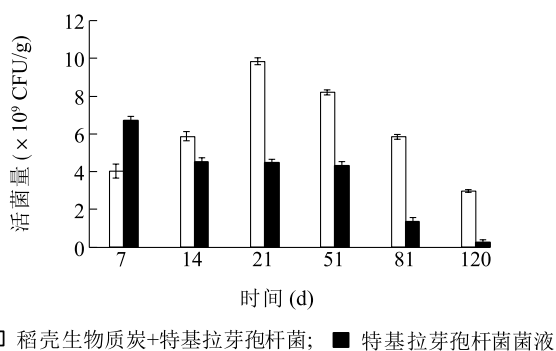


图 4 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 土壤存活时间的影响

Fig.4 Effects of rice husk-derived biochar on the survival time of *B. tequilensis*

为 83.1%, 显著高于特基拉芽孢杆菌菌液处理的防效(72.5%)(表 2)。由表 3 可知, 载特基拉芽孢杆

表 3 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 对西瓜苗期生长的影响

Table 3 Effects of the *B. tequilensis* boarded by rice husk-derived biochar on the growth of watermelon at seedling stage

处理	株高 (mm)		根长 (cm)		鲜质量 (mg)		干质量 (mg)	
	测定值	增效 (%)	测定值	增效 (%)	测定值	增效 (%)	测定值	增效 (%)
D	270.7	90.5c	112.5	75.2c	2 382.9	56.3b	199.8	54.4c
C	164.7	15.9b	88.9	38.5b	1 766.4	15.9a	165.4	27.8b
B	158.3	11.4a	82.3	28.2a	1 750.8	14.9a	150.6	16.4a
A	142.1		64.2	—	1 524.4	—	129.4	—

处理 A、B、C、D 见表 2 注。同一列数据后不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

## 2.5 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌对土壤酶活性的影响

由图 5 可见, 在土壤中施入特基拉芽孢杆菌菌液后, 土壤过氧化氢酶和脲酶活性分别为 1.38  $\mu\text{mol/g}$  和 1.36  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 分别较对照[对照土壤过氧化氢酶活性为 1.04  $\mu\text{mol/g}$ , 脲酶活性为 1.33  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ ]显著升高; 土壤中蔗糖酶和脱氢酶活性分别为 2.68  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  和 27.02  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 与对照[对照土壤蔗糖酶活性为 2.61  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 脱氢酶活性为 26.45  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ ]相比升高均不显著; 纤维素酶和中性蛋白酶活性分别为 1.42  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  和 4.09  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 较对照[对照土壤纤维素酶活性为 1.77  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 中性蛋白酶活性为 6.70  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ ]显著下降。当稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌施入土壤后, 过氧化氢酶、脲酶、纤维素酶、蔗糖酶及脱氢酶活性分别为 4.40  $\mu\text{mol/g}$ 、1.43  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ 、3.05  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ 、3.36  $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$  和

菌稻壳生物炭处理, 显著促进西瓜苗期株高、根长增长, 促进鲜质量及干质量等生物量的增长。

表 2 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 对西瓜苗期枯萎病的防治效果

Table 2 The control effects of the *B. tequilensis* boarded by rice husk-derived biochar on watermelon wilt diseases at seedling stage

处理	发病率 (%)	病情指数	相对防效 (%)
D	9.3 $\pm$ 0.3a	13.6 $\pm$ 0a	83.1c
C	15.2 $\pm$ 0.7b	29.5 $\pm$ 0.2c	70.1a
B	14.6 $\pm$ 0.4b	22.1 $\pm$ 0.5b	72.5b
A	99.8 $\pm$ 0.1d	80.5 $\pm$ 0.5d	—

A: 对照; B: 6 ml 特基拉芽孢杆菌菌液; C: 3 g 载特基拉芽孢杆菌稻壳生物炭; D: 6 g 载特基拉芽孢杆菌稻壳生物炭。同一列数据后不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

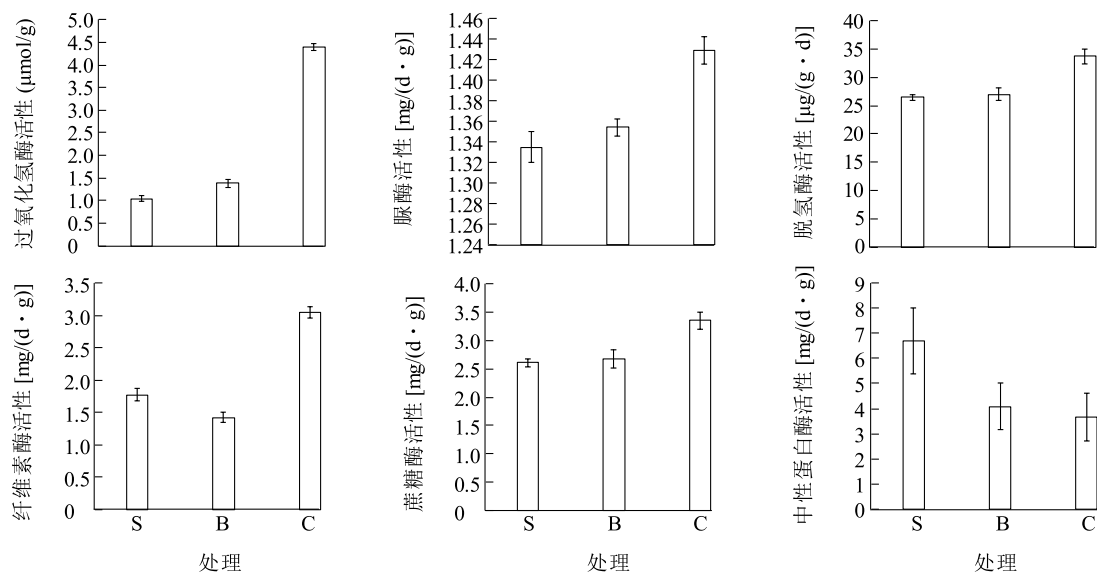
33.72  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 较对照显著升高; 土壤中的中性蛋白酶活性为 3.65  $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ , 较对照显著下降。以上结果表明, 生物炭在影响土壤酶活性中起到了关键作用。

## 3 讨论

稻壳与稻草的组成成分大致相似, 主要是由纤维素、半纤维素、木质素、少量灰分及其他成分组成, 组分间比例受土壤类型、气候条件、收集时间等因素影响较大<sup>[29]</sup>。生物质半纤维素的分解温度为 200~260  $^{\circ}\text{C}$ , 纤维素的分解温度为 240~350  $^{\circ}\text{C}$ , 木质素的分解温度为 280~500  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[30]</sup>。因此原料中这些组分的比例影响生物炭的活性程度及在热解过程中的结构变化。本研究中, 在原料与制备工艺一致的条件下, 影响稻壳生物炭特性的关键因素是最高热解温度, 其中 D500 的 BET 比表面积、微孔表面积、外表面积、总孔容等参数最高, 且在菌液中 2 h, 单位质量

的吸菌量最高。杨卓等<sup>[31]</sup>在芦苇生物炭的制备、表征及吸附性能的研究中,发现 500 ℃ 制备的芦苇生

物炭吸附特性及对氮气的吸附量最大,与本研究结果一致。



S: 大田土壤(对照); B: 施特基拉芽孢杆菌菌液处理; C: 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌处理。

图5 稻壳生物炭搭载 *B. tequilensis* 对土壤酶活性的影响

Fig.5 Effects of the *B. tequilensis* boarded by rice husk-derived biochar on soil enzyme activities

微生物固定化技术是一种重要的生物强化方法,主要利用不同的固定化载体为外源微生物提供有利环境以降低与土著微生物的竞争作用和其他环境因素造成的不利影响,保证添加的外源微生物的活性,增加其数量及微生物作用的稳定性<sup>[32]</sup>。本研究利用稻壳生物炭固定搭载特基拉芽孢杆菌施入土壤后,菌量呈现增长的趋势,相较直接接种菌液处理,显著增加了特基拉芽孢杆菌的数量,且延长其在土壤中存活时间。这可能是由于生物炭含有一定量易分解的有机物质可为微生物生长提供碳源和氮源<sup>[33]</sup>,丰富的孔隙及蓄水性能<sup>[34-35]</sup>,为微生物提供附着位点和较大的生存空间<sup>[36]</sup>,以及高稳定性的芳香烃结构<sup>[37]</sup>为微生物的栖息生活提供了良好的微环境,保证了微生物在土壤中稳定存在<sup>[38]</sup>。由于生物炭的优良性能及低廉的成本,近年来其作为微生物载体广泛应用于水环境污染治理<sup>[39-41]</sup>、土壤重金属钝化<sup>[42]</sup>及有机污染物的降解修复<sup>[43-44]</sup>等领域。此外,王潇敏等<sup>[45]</sup>利用生物炭搭载固定解钾胶冻样芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*),延缓了该菌在土壤的数量的减少,提高了处理土壤的有效态钾的含量,促进番茄增产及品质的提高。本研究将生物炭固定搭载微生物技术应用于西瓜枯萎病防治,特基

拉芽孢杆菌经稻壳生物炭固定搭载后显著提高了其对西瓜枯萎病的防治效果,同时能够促进西瓜幼苗生长。本研究结果为利用生物炭固定搭载生防微生物防治作物土传病害提供了一定的依据。

土壤酶活性作为评价土壤肥力的重要指标之一,反映了土壤中各种生物化学过程的强度和方向,提高土壤酶活性,对改善土壤生态环境、提高土壤肥力和作物产量具有重要意义<sup>[46]</sup>。本研究中稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌显著增强了土壤中过氧化氢酶、脲酶、蔗糖酶、纤维素酶及脱氢酶活性,抑制了中性蛋白酶活性,其中生物炭在其中起到了关键作用。土壤脲酶是土壤中主要的水解酶之一,能催化尿素水解成氨,对作物有效利用尿素有重大的影响<sup>[47]</sup>,其活性可以表征土壤中有机态氮向有效态氮的转化能力和土壤无机氮的供应能力。土壤过氧化氢酶能够酶促生物呼吸过程和有机物的氧化反应产生的过氧化氢分解为水和氧气,缓解或消除过氧化氢对土壤生物及作物的毒害作用<sup>[48]</sup>。土壤蔗糖酶的活性与土壤有机质积累和转化状况有关,同时也反映了土壤的营养状况<sup>[49]</sup>。有研究结果表明在田间施用适量生物炭(20~30 t/hm<sup>2</sup>)能够显著增强土壤中脲酶和过氧化氢酶活性,并促进作物产量提高,

但是随着生物炭施用量进一步升高,土壤中脲酶和过氧化氢酶活性降低<sup>[46,50]</sup>。在田间施用3%生物炭能够促进土壤中脲酶和过氧化氢酶活性,但是对蔗糖酶活性没有影响<sup>[51]</sup>。土壤中的纤维素酶及蛋白酶参与土壤中高分子物质的降解,参与土壤中碳循环,属于土壤碳循环酶类。尚艺婕等<sup>[52]</sup>研究发现,当土壤中Cd含量为1.0 mg/kg时,施入2.5%的生物炭时,水稻非根际土壤蛋白酶的活性最高;生物炭施入量10%时,纤维素酶的活性最高。当土壤中Cd含量为2.5 mg/kg及5.0 mg/kg时,非根际土壤蛋白酶的活性随着生物炭施入量的升高依次递增,且当输入10%的生物炭时活性达到最高,而纤维素酶的活性随着生物炭施入量的升高而递减。以上研究结果表明,生物炭对土壤酶活性的影响随着生物炭的种类、施用量、土壤性质、土壤中的污染物以及其他因素的不同而结果各异。因此,今后还需要对稻壳生物炭的输入量、作物根际土壤酶变化的时间规律、生物及非生物影响因素进行研究,以期能更好地利用生物炭搭载生防微生物防治作物土传病害。

## 参考文献:

- [1] 鲍婉雪,钟川,赵文宗,等. 瓠瓜砧木嫁接西瓜苗对枯萎病的抗性综合评价[J]. 南方农业学报,2017,48(3):441-447.
- [2] LYU G, GUO S, ZHANG H, et al. Transcriptional profiling of watermelon during its incompatible interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 131(4): 585.
- [3] 任迁琪,吴洪生,李季,等. 西瓜枯萎病拮抗链霉菌分离鉴定及盆栽抗病试验[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 107-113.
- [4] 李晓慧,梁慎,常高正,等. 西瓜枯萎病苗期抗性鉴定及抗源筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):91-94.
- [5] 王小慧,张国漪,李蕊,等. 拮抗菌强化的生物有机肥对西瓜枯萎病的防治作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(1): 223-231.
- [6] 吕湘江,李清萍,范淑英. 西瓜枯萎病综合防治研究进展[J]. 北方园艺, 2015, 37(6): 187-190.
- [7] LI X, ZHANG Y, WEI Z, et al. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis [J]. PLoS ONE, 2016, 11(9): e0162125.
- [8] 谢洁,任慧爽,唐翠明,等. 一株桑树内生细菌的鉴定和对桑椹核地杖菌的拮抗作用[J]. 蚕业科学, 2015, 41(5): 815-824.
- [9] 王瑶,赵月菊,邢福国,等. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 核农学报, 2017, 31(6): 1128-1136.
- [10] 冯云利,奚家勤,马莉,等. 烤烟品种NC297内生细菌中拮抗烟草黑胫病的生防菌筛选及种群组成成分[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2011, 33(4): 488-496.
- [11] GHOLAMI M, KHAKVAR R, ALIASGHARZAD N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants [J]. Scripted HTML Pflanzenschutz, 2013, 46(15): 1831-1838.
- [12] 袁雪,侯旭,胡晓,等. 桃褐腐病拮抗细菌的筛选、鉴定及生防作用[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(4): 7-13.
- [13] RANIA A B A, JABNOUN-KHIAREDDINE H, NEFZI A, et al. Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Solanum elaeagnifolium* stems [J]. Biological Control, 2016, 97(10): 80-88.
- [14] 张猛,王琼,冯发运,等. 植物内生特基拉芽胞杆菌的分离、鉴定及防治西瓜枯萎病效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 371-377.
- [15] 孔丝纺,姚兴成,张江勇,等. 生物质炭的特性及其应用的研究进展[J]. 生态环境学报,2015, 24(4): 716-723.
- [16] 朱灵峰,何怡雪,耿悦,等. 还原剂改性生物炭吸附亚甲基蓝的动力学[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(9): 232-234.
- [17] KASOZI G N, ZIMMERMAN A R, NKEDIKIZZA P, et al. Catechol and humic acid sorption onto a range of laboratory produced black carbons (Biochars) [J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(16): 6189-6195.
- [18] 陈红卫,张重路,王一山,等. 生物质炭对重金属污染土壤中汞的赋存形态及运移分配的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8): 312-315.
- [19] 刘冲,刘晓文,吴文成,等. 生物炭及炭基肥对油菜菜生长及吸收重金属的影响[J]. 中国环境科学, 2016, 36(10): 3064-3070.
- [20] 王旭峰,郑立安,刘毛,等. 改性玉米芯生物炭对废水中铜和氨氮的吸附[J]. 工业水处理, 2017, 37(1): 37-41.
- [21] 尹微琴,孟莉蓉,郁彬琦,等. 垫料生物炭对土壤镉的钝化作用[J]. 江苏农业学报,2018,34(1):62-67.
- [22] 唐行灿,陈金林. 生物炭对土壤理化和微生物性质影响研究进展[J]. 生态科学, 2018, 37(1): 192-199.
- [23] 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: 960-966.
- [24] ZWART D C, KIM S H. Biochar amendment increases resistance to stem lesions caused by *Phytophthora* spp. in tree seedlings [J]. Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science, 2012, 47(12): 1736-1740.
- [25] 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(1): 110-118.
- [26] 桑军强,王志农,李福志,等. 饮用水生物处理中微生物量和活性的测定方法[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(8): 88-90.
- [27] 南宇航,朱子成,王学征,等. 甜瓜种质资源苗期对枯萎病和白粉病的抗性评价[J]. 中国蔬菜, 2016(1): 37-44.

- [28] 苏州科铭生物技术有限公司. 生化试剂盒:土壤系列 [EB/OL]. (2011-09-15) [2019-02-22]. <http://www.cominbio.com/a/shijihe/shenghuashiji/turangxilie/>.
- [29] 任天宝,尹双耀,马孝琴,等. 几种化学物质对稻草秸秆酶解糖化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(1): 206-211.
- [30] HAMELINCK C N, HOOIJDONK G V, FAAJJ A P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term [J]. Biomass and Bioenergy, 2005, 28(4): 384-410.
- [31] 杨 卓,陈 婧,揣 莹. 芦苇生物质炭的制备、表征及吸附性能[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 464-467.
- [32] CUNNINGHAM C J, IVSHINA I B, LOZINSKY V I, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, 54(2/3): 167-174.
- [33] GHEORGHE C, MARCULESCU C, BADEA A, et al. Effect of pyrolysis conditions on biochar production from biomass [C]//PERLOVSKY L, DIONYSIOU D, ZADEH L, et al. Energy Problems and Environmental Engineering. Canary Islands, Spain: WSEAS Press, 2009: 239-241.
- [34] KOLB S E, FERMANICH K J, DORNBUSH M E. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils [J]. Soil Science Society of American Journal, 2009, 73(4): 1173-1181.
- [35] KOLTON M, HAREL Y M, PASTERNAK Z, et al. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants [J]. Applied and Environment Microbiology, 2011, 77(14): 4924-4930.
- [36] 卜晓莉,薛建辉. 生物炭对土壤生境及植物生长影响的研究进展[J]. 生态环境学报, 2014, 23(3): 535-540.
- [37] KNICKER H. How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon: a review [J]. Biogeochemistry, 2007, 85(1): 91-118.
- [38] 袁金华,徐仁扣. 生物质炭的性质及其对土壤环境功能影响的研究进展[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4): 779-785.
- [39] 迟建国,吕吉利,高永超,等. 生物炭固定化菌剂对含油海水中石油的去除[J]. 工业安全与环保, 2015, 41(6): 13-16, 29.
- [40] 袁 敏,刘晓冰,唐美珍,等. 生物炭固定菌强化人工湿地对低温污水中氮素去除的模拟研究[J]. 生态与农村环境学报, 2018, 34(5): 463-468.
- [41] 黄 茜,蒋梦莹,王丽晓,等. 竹炭固定化微生物对水中壬基酚的降解效率[J]. 应用生态学报, 2018, 29(5): 1677-1685.
- [42] 戚 鑫,陈晓明,肖诗琦,等. 生物炭固定化微生物对 U、Cd 污染土壤的原位钝化修复[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(8): 1683-1689.
- [43] LIU L, CHEN P, SUN M X, et al. Effect of biochar amendment on PAH dissipation and indigenous degradation bacteria in contaminated soil [J]. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15: 313-322.
- [44] 陈思尹. 多环芳烃降解菌的筛选及生物炭固定化菌剂对土壤的修复[D]. 上海:上海师范大学, 2017: 36-46.
- [45] 王潇敏,李恋卿,潘根兴,等. 胶冻样芽孢杆菌与生物质炭复配及对番茄产量和品质的影响[J]. 土壤, 2016, 48(3): 479-485.
- [46] 韩召强,陈效民,曲成闯,等. 生物质炭施用对潮土理化性状、酶活性及黄瓜产量的影响[J]. 水土保持学报, 2017, 31(6): 272-278.
- [47] GUO Y, LI L, WEI C, et al. Effect of nitrogen fertilizer on biomass amount and soil enzymes activity of desert grassland in Xinjiang [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2011, 27(13): 249-256.
- [48] 郭天财,宋 晓,马冬云,等. 施氮量对冬小麦根际土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(1): 110-114.
- [49] NIE C, YANG X, NIAZI N K, et al. Impact of sugarcane bagasse-derived biochar on heavy metal availability and microbial activity: A field study [J]. Chemosphere, 2018, 200: 274-282.
- [50] 韩召强,陈效民,曲成闯,等. 生物质炭对黄瓜连作土壤理化性状、酶活性及土壤质量的持续效应[J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(5): 1227-1236.
- [51] 聂天宏,韩学博,王海龙,等. 不同种类生物质炭对植烟土壤保育及烤烟生长和品质的影响[J]. 水土保持学报, 2018, 32(6): 346-351, 358.
- [52] 尚艺婕,张 秀,王海波,等. 秸秆生物质炭对镉污染水稻根际酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(8): 1532-1540.

(责任编辑:陈海霞)