



## 研究报告

## 烤烟 K326 与香料植物间作模式下根际土可培养细菌多样性及功能

刘冰冰<sup>1</sup> 郭书贤<sup>1</sup> 陈兴<sup>2</sup> 刘正宇<sup>1</sup> 周开心<sup>1</sup> 宋豪锋<sup>1</sup> 陈微<sup>\*2</sup> 李文均<sup>\*3</sup>

1 南阳理工学院 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室 河南 南阳 473004

2 云南中烟工业有限责任公司技术中心 云南 昆明 650231

3 中山大学生命科学学院 广东 广州 510275

**摘要:**【背景】烤烟是我国重要的经济作物,选择间作种植方式能影响根际微生物的多样性,缓解烤烟连作障碍;根际微生物能够适应根际微环境的变化,对烤烟的生长具有一定促进作用。【目的】研究不同生长时期烤烟 K326 与 5 种香料植物间作模式下烤烟根际土细菌种群多样性,从生物多样性角度比较不同时期、不同间作模式的差异,探究烤烟根际微生物的适应性及功能。【方法】以不同生长期、不同香料植物间作模式下烤烟根际土为研究对象,设计纯培养方法对根际细菌进行分离及 16S rRNA 基因测序,研究不同种植期、不同间作模式下根际土细菌多样性,并挑选代表菌株进行烟碱、Cr<sup>6+</sup>耐受及促生性质检测。【结果】蕾薹期、开花结果期、采摘期烤烟 K326 与 5 种香料植物间作模式下植物根际土蕴含丰富的细菌资源,共分离到 707 株细菌,分布于 70 个属。蕾薹期烤烟根际土细菌的香农指数变化为:W (4.079 191 7)>2GAY (3.840 352 1)>2GDY (3.514 562 8)>2GCKY (3.497 703 4)>2GBY (3.447 478 9)>2GCY (3.253 409 2)>2GEY (3.241 103 4);开花结果期烤烟根际土细菌的香农指数变化为:3GAY (3.688 981 7)>3GCKY (3.442 125 1)>3GBY (3.353 155 8)>3GDY (3.349 171 9)>3GEY (3.306 294 5)>3GCY (3.305 582 2);采摘期烤烟根际土细菌的香农指数变化为:5GEY (2.857 102 8)>5GBY (2.458 311 3)>5GAY (2.271 868 5)>5GCKY (2.210 253 6)>5GCY (2.079 441 5)>5GDY (0.693 147 2);在不同时期都检测到的细菌类群有节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、短波芽胞杆菌属(*Brevibacillus*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioide*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和地杆菌属(*Terrabacter*),大部分代表菌株具有烟碱耐受、Cr<sup>6+</sup>耐受、固氮、铁载体产生、溶磷、淀粉水解等特性。【结论】不同生长时期、不同间作模式的烤烟根际土中蕴含丰富的细菌类群,*Bacillus*、*Pseudomonas* 和 *Streptomyces* 是烤烟根际土中的优势类群,在烟碱、Cr<sup>6+</sup>耐受及促生作用方面具有重要应用潜力;香料植物与烤烟间作模式能够改变根际土细菌的多样性;在开花结果期,5 种香料植物与烤烟的间作明显增加了土壤根际土可培养细菌的多样性;薄荷、香茅草、香叶天竺葵间作类型在缓解烤烟连作障碍方面具有优势。

关键词: 烤烟, 间作模式, 可培养, 根际细菌, 多样性

**Foundation items:** Key Science and Technology Projects of China National Tobacco Corporation (110201402042); Science and Technology Project of Yunnan China Tobacco Industry Company Limited (2015CP01)

**\*Corresponding authors:** Chen Wei: Tel: 86-871-65868483; E-mail: kibchenwei@126.com

Li Wen-jun: Tel: 86-20-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

**Received:** 10-08-2019; **Accepted:** 12-02-2020; **Published online:** 29-04-2020

**基金项目:** 中国烟草总公司科技重点项目(110201402042); 云南中烟工业有限责任公司科技项目(2015CP01)

**\*通信作者:** 陈微: Tel: 0871-65868483; E-mail: kibchenwei@126.com

李文均: Tel: 020-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-08-10; **接受日期:** 2020-02-12; **网络首发日期:** 2020-04-29

## Diversity and function of culturable rhizospheric bacteria of flue-cured tobacco K326 intercropped with five spice plants

LIU Bing-Bing<sup>1</sup> GUO Shu-Xian<sup>1</sup> CHEN Xing<sup>2</sup> LIU Zheng-Yu<sup>1</sup> ZHOU Kai-Xin<sup>1</sup>  
SONG Hao-Feng<sup>1</sup> CHEN Wei<sup>\*2</sup> LI Wen-Jun<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup> Nanyang Institute of Technology, Henan Key Laboratory of Industrial Microbial Resources and Fermentation Technology, Nanyang, Henan 473004, China

<sup>2</sup> Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Company Limited, Kunming, Yunnan 650231, China

<sup>3</sup> School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China

**Abstract:** [Background] Flue-cured tobacco is an important economic crop in China. Intercropping affects the diversity of rhizospheric microorganisms and alleviates the production of flue-cured tobacco. Rhizospheric microorganisms can adapt to changes in the rhizosphere microenvironment, which promotes the growth of flue-cured tobacco. [Objective] We examined the diversity of the bacterial population in flue-cured tobacco's rhizosphere soil under the intercropping models between tobacco K326 and five spice plants at different growth periods. In addition, we compared the variances in intercropping models in various growing periods from the perspective of biological diversity and subsequently screened the adaptability and functional characteristic of typical rhizosphere bacterium. [Methods] Soil samples from various growing periods with different intercropping patterns were collected. We designed the culturing method to isolate and sequence the 16S rRNA gene, and calculated the diversity index. Representative strains were selected to detect nicotine and Cr<sup>6+</sup> tolerance as well as growth-promoting properties. [Results] A total of 707 bacterial strains distributed in 70 genera were isolated. The change of the Shannon index of bacteria in flue-cured tobacco's rhizosphere soil at the stem elongation period was W (4.079 191 7)>2GAY (3.840 352 1)>2GDY (3.514 562 8)>2GCKY (3.497 703 4)>2GBY (3.447 478 9)>2GKY (3.253 409 2)>2GEY (3.241 103 4). The change of Shannon index of bacteria in flue-cured tobacco's rhizosphere soil at the leaf ripening period was 3GAY (3.688 981 7)>3GCKY (3.442 125 1)>3GBY (3.353 155 8)>3GDY (3.349 171 9)>3GEY (3.306 294 5)>3GKY (3.305 582 2). The change of Shannon index of bacteria in flue-cured tobacco's rhizosphere soil at the harvesting period was 5GEY (2.857 102 8)>5GBY (2.458 311 3)>5GAY (2.271 868 5)>5GCKY (2.210 253 6)>5GKY (2.079 441 5)>5GDY (0.693 147 2). The genera *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevendimononas*, *Microbacterium*, *Nocardioideis*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Terrabacter* were detected at all the three growth periods. Majority of the representative strains exhibit positive activities for nicotine tolerance, Cr<sup>6+</sup> tolerance, nitrogen fixation, siderophore production, phosphorus solubilization and starch hydrolysis. [Conclusion] Rhizosphere soil contained abundant bacterial resources under the intercropping mode between five spice plants and the flue-cured tobacco K326. Among the dominant bacterial groups in flue-cured tobacco's rhizosphere soil, the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* have potential applicability in nicotine tolerance, Cr<sup>6+</sup> tolerance and growth-promoting effects. The intercropping can change the diversity of bacteria in rhizosphere soil of flue-cured tobacco. In the tobacco leaf ripening period, the intercropping of five spice plants and flue-cured tobacco significantly increased the diversity of cultivable bacteria in the rhizosphere soil. The intercropping types of *Monarda didyma*, *Cymbopogon citratus* and *Pelargonium graveolens* own advantages in relieving continuous cropping of flue-cured tobacco.

**Keywords:** Flue-cured tobacco, Intercropping mode, Culturable, Rhizospheric bacteria, Diversity

烤烟是我国重要的经济作物,在其种植过程中会产生连作障碍、重金属富集、土壤养分流失、环境污染等问题,不仅制约国民经济的发展,而且对生态可持续及人类健康产生不利影响。寻求一条经济、环保、健康的方法来解决烤烟种植生产中的不利影响是目前探究的主要方向。微生物技术成为烤

烟种植生产中常用的解决方案,如:利用微生物制剂来解决农业生产中病虫害<sup>[1]</sup>;利用微生物促生菌菌肥促进农作物生长等<sup>[2]</sup>。微生物与植物在长期进化适应过程中形成了稳定的微生物群落,为了能进一步开发烤烟相关微生物产品,获得宝贵的具有应用价值的可培养微生物资源显得尤为重要。刘训理

等<sup>[3]</sup>采用纯培养方法分离到大量自生固氮菌、磷细菌、钾细菌等具有生态功能的根际微生物。顾金刚等<sup>[4]</sup>从烟田根际土中分离到能够对黑胫病具有抗性的微生物, 分别属于假单孢菌属(*Pseudomonas*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)。刘璇等<sup>[5]</sup>从烤烟根际土中分离到产生速效钾的能力较强的菌株, 包括变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、弯曲芽胞杆菌(*Bacillus flexus*)。

在农业耕作方面, 选择合适的耕作模式能够缓解烤烟的连作障碍。研究表明: 在长期连作和受外界胁迫(低温、高温、干旱等)条件下, 会降低烤烟根际细菌的多样性, 细菌群落组成单一化<sup>[6-7]</sup>。采用间作的耕作模式, 不仅能够提高土壤微生物群落多样性、增强抗性、缓解连作障碍, 而且在提高产品产量及品质方面也具有重要作用<sup>[8-9]</sup>。

烤烟 K326 是云南主产烤烟品种, 该品系对于维持根际土壤微生物多样性较其他品系有明显优势<sup>[10]</sup>。采用香料植物间作能够增加烤烟产品附加

值<sup>[11]</sup>。土壤酶活性及微生物数量会随着植物的不同生长阶段发生相应的变化<sup>[12]</sup>。本实验采用纯培养的方法来探索蕾薹期、开花结果期、采摘期烤烟 K326 与 5 种香料植物间作模式下植物根际土细菌种群分布, 探究不同间作模式下根际土细菌多样性的变化, 挑选部分代表菌株对烟碱及  $\text{Cr}^{6+}$  耐受、促生等方面进行检测, 以期为进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用云南省石林县印象山庄温室内的 5 种间作模式的 3 个生长时期(蕾薹期、开花结果期、采摘期)烤烟植物根际土, 采用三点采样法, 随机挑取 3 株中等株高、长势好、健康的烤烟植物的根际土(距地表 10–20 cm), 4 °C 保藏。选择的间作香料植物分别是香叶天竺葵(*Pelargonium graveolens*)、香茅草(*Cymbopogon citratus*)、甜罗勒(*Ocimum basilicum*)、迷迭香(*Rosemarinus officinalis*)、薄荷(*Monarda didyma*)。样品信息如表 1 所示。

表 1 样品信息

Table 1 Samples information

耕作类型 Tillage type	蕾薹期烤烟 Tobacco stem elongation period	开花结果期烤烟 Tobacco leaf ripening period	采摘期烤烟 Tobacco harvesting period
A: 香叶天竺葵×烟草间作 A: The intercropping model of <i>Pelargonium graveolens</i> and flue-cured tobacco	2GAY	3GAY	5GAY
B: 香茅草×烟草间作 B: The intercropping model of <i>Cymbopogon citratus</i> and flue-cured tobacco	2GBY	3GBY	5GBY
C: 甜罗勒×烟草间作 C: The intercropping model of <i>Ocimum basilicum</i> and flue-cured tobacco	2GCY	3GCY	5GCY
D: 迷迭香×烟草间作 D: The intercropping model of <i>Rosemarinus officinalis</i> and flue-cured tobacco	2GDY	3GDY	5GDY
E: 美国薄荷×烟草间作 E: The intercropping model of <i>Monarda didyma</i> and flue-cured tobacco	2GEY	3GEY	5GEY
CK: 单作烤烟 CK: Monoculture flue-cured tobacco	2GCKY	3GCKY	5GCKY
W: 原始土 W: The original soil	—	—	—

注: 原始土 W 为统一调配水、肥, 搅拌均匀的土壤, 后分配于不同的温室中, 以种植不同模式的植物。—: 未种植烤烟。

Note: The original soil W is an uniform mix of water, fertilizer and even soil, which is distributed in different greenhouses to plant different types of plants. —: Uncultivated of flue-cured tobacco.

## 1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Taq PCR StarMix, GenStar 公司; 其余常用的化学试剂均为国产 AR 级, 阿拉丁试剂(上海)有限公司。生化培养箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; 数显恒温摇床, 苏州威尔实验用品有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 超声波清洗仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

## 1.3 分离培养基

选择 M-7、T3 和烟叶浸汁培养基 Y<sup>[13]</sup>。

## 1.4 方法

### 1.4.1 分离方法

每个样点的 3 份重复土样混合均匀, 常温下自然风干, 采用梯度稀释法, 取 100 μL 10<sup>-3</sup> 稀释浓度的土壤溶液涂布于不同培养基上, 每种培养基做 3 个重复。

### 1.4.2 微生物 16S rRNA 基因序列鉴定

参照陈微等<sup>[14]</sup>方法进行 16S rRNA 基因测序及比对。

### 1.4.3 部分菌株生物活性筛选

参照刘冰冰<sup>[13]</sup>方法进行菌株的溶磷、烟碱利用、Cr<sup>6+</sup>离子耐受、固氮、产铁载体、解淀粉等生物活性检测。

### 1.4.4 多样性指数计算

根据 16S rRNA 基因序列测序结果, 按照 EzBioCloud 网站比对结果进行判断, 以 16S rRNA 基因序列相似性 98.5% 作为新种的分类标准<sup>[15]</sup>, 以种作为 OTU 分类标准, 统计各样点不同 OTU 数目, 运用 R 软件进行香农指数及辛普森指数计算<sup>[16]</sup>。通过对比香农指数判断纯培养分离效果。

## 2 结果与分析

蕾薹期、开花结果期、采摘期是烤烟植物生长的 3 个关键时期, 不同生长时期烤烟植物的生理状态不同, 微生物的菌群分布及数量会发生相应变化。具体蕾薹期、开花结果期、采摘期烤烟与 5 种香料植物的间作类型中, 根际土及植物内生微生物会发生怎样的变化, 从微生物的菌群分布判断哪种间作类型比较有利于烤烟的生长, 植物生长的不同时期, 微生物的菌群分布也会相应发生变化。部分分离平板、纯培养物如图 1 所示。

### 2.1 原始土中分离到的细菌菌群分布情况

温室原始土 W 中共分离到 117 株细菌, 分布于无色小杆菌属(*Achromobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、放线纤维菌属(*Actinotalea*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、拟无枝菌酸氏菌属(*Amycolatopsis*)、农霉菌属(*Agromyces*)、*Arthrobacter*、*Bacillus*、短波杆菌属(*Brevibacterium*)、

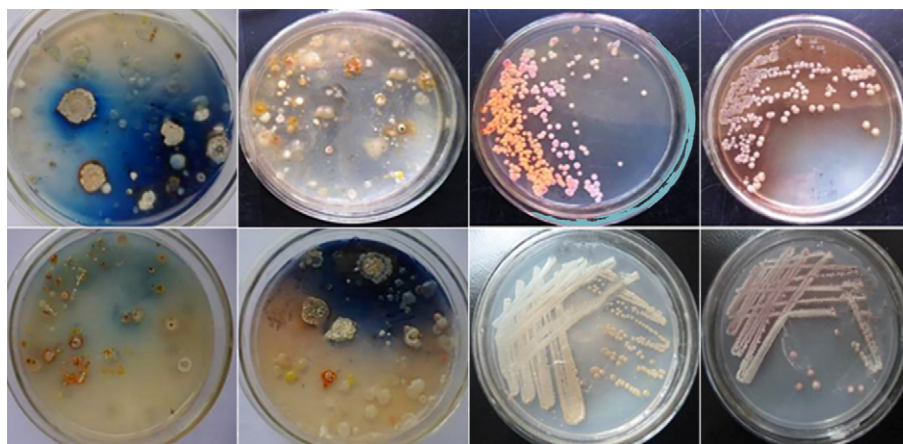


图 1 部分分离平板及纯培养菌株

Figure 1 The isolation plates and cultivated strains

金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、肠球菌属(*Enterobacter*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、马塞利亚菌属(*Massilia*)、*Microbacterium*、小单胞菌属(*Micromonospora*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、*Nocardioide*s、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、

*Rhodococcus*、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、*Streptomyces*和*Terrabacter* 共计 30 个属的 71 个种<sup>[13]</sup>。其中,*Streptomyces*、*Nocardioide*s和*Bacillus*的数量比较多。

2.2 蕾薹期 5 种间作模式下烤烟植物根际土细菌种群分布

蕾薹期烤烟植物根际土中共获得 337 株细菌,各间及单作类型根际土细菌分离情况<sup>[13]</sup>如表 2 所示。

表 2 蕾薹期不同样点样品菌种分布及数量

Table 2 The number and composition of different samples at tobacco stem elongation period

耕作类型	分离到的菌株分布属	属数目	种数目	菌株总数
Tillage type	Genus distribution of isolated strains	Number of genera	Number of species	Number of strains
2GAY	<i>Aeromicrobium</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Devosia</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Massilia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioide</i> s, <i>Noviherbaspirillum</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharothrix</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Terrabacter</i>	22	57	90
2GBY	<i>Acidovorax</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Advenella</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Tsukamurella</i>	17	35	50
2GKY	<i>Brevibacterium</i> , <i>Advenella</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Pusillimonas</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Saccharothrix</i> , <i>Staphylococcus</i>	14	33	51
2GDY	<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Bosea</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Rubellimicrobium</i> , <i>Devosia</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Streptomyce</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Tsukamurella</i>	18	37	47
2GEY	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Humibacter</i> , <i>Nocardioide</i> s, <i>Rhizobium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Pseudomonas</i>	12	29	43
2GCKY	<i>Achromobacter</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Massilia</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioide</i> s, <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Variovorax</i>	17	38	56

2.3 开花结果期 5 种间作模式下烤烟植物根际土细菌种群分布

开花结果期各样点中共获得 304 株细菌, 各间作及单作类型根际土细菌分离情况<sup>[13]</sup>如表 3 所示。

2.4 采摘期 5 种间作模式下烤烟植物根际土细菌种群分布

采摘期烤烟各样点中共获得 66 株细菌。各间作及单作类型根际土细菌分离情况<sup>[13]</sup>如表 4 所示。

2.5 不同生长时期烤烟根际细菌菌群分布及烤烟相关菌株的部分生物学特性检测

蕾薹期烤烟 K326 与 5 种香料植物间作模式下植物根际土蕴含丰富的细菌资源, 不同间作模式下烤烟根际土分离到的细菌的种类及数量较单作烤烟及原始土有较大差异, 说明间作模式能够改变根际土细菌的分布。从不同生长时期的各间作烤烟根际土中共获得 707 株细菌, 分布于 70 个属。从培养基的分离效果来看, M-7 培养基共分离得到 318 株细菌, 包括 42 个属, 尤其对细菌形态的微生

表 3 开花结果期不同样点样品菌种分布及数量

Table 3 The number and composition of different samples at tobacco leaf ripening period

耕作类型 Tillage type	分离到的菌株分布属 Genus distribution of isolated strains	属数目 Number of genera	种数目 Number of species	菌株总数 Number of strains
3GAY	<i>Achromobacter</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bosea</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microlunatus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Terrabacter</i>	20	43	53
3GBY	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Flexivirga</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Phycococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Variovorax</i>	16	33	48
3GCY	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bosea</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Variovorax</i>	11	30	43
3GDY	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bosea</i> , <i>Ensifer</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Knoellia</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Niabella</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingopyxis</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Variovorax</i>	18	34	56
3GEY	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Dyella</i> , <i>Ensifer</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Variovorax</i>	17	33	48
3GCKY	<i>Agromyces</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bosea</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Rhodanobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Terrabacter</i>	18	37	56

表 4 采摘期不同样点样品菌种分布及数量

Table 4 The number and composition of different samples at tobacco harvesting period

耕作类型	分离到的菌株分布属	属数目	种数目	菌株总数
Tillage type	Genus distribution of isolated strains	Number of genera	Number of species	Number of strains
5GAY	<i>Terrabacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Massilia</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Bacillus</i>	6	10	11
5GBY	<i>Yonghaparkia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Arthrobacter</i>	7	12	13
5GCY	<i>Micrococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i>	4	8	8
5GDY	<i>Massilia</i> , <i>Nocardioideis</i>	2	2	2
5GEY	<i>Agrococcus</i> , <i>Altererythrobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Lentzea</i>	7	18	20
5GCKY	<i>Streptomyces</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i>	3	10	12

物的分离效果较好; T3 培养基共分离到 306 株细菌, 包括 47 个属, 对一些稀有类群的检出效果较好, 尤其是放线菌的分离效果较好; Y 培养基共分离得到 83 株细菌, 分布于 12 个属, 结合后续部分菌株的生物学特性检测, 能够验证此培养基对于耐烟碱微生物的分离效果较好; 3 种培养基的组合能够较好地展现烤烟根际细菌的纯培养分离效果。从分离菌株数量上来看, 蕾薹期>开花结果期>采摘期; 蕾薹期共分离到 47 个属, 包括 *Achromobacter*、嗜酸菌属 (*Acidovorax*)、*Acinetobacter*、小陌生菌属 (*Advenella*)、气微菌属 (*Aeromicrobium*)、农球菌属 (*Agrococcus*)、*Amycolatopsis*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、博斯氏菌属 (*Bosea*)、小短杆菌属 (*Brachybacterium*)、*Brevibacillus*、*Brevibacterium*、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、德沃斯氏菌属 (*Devosia*)、草螺菌属 (*Herbaspirillum*)、居土杆菌属 (*Humibacter*)、*Kribbella*、伦茨氏菌属 (*Lentzea*)、*Massilia*、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、*Microbacterium*、*Micromonospora*、*Mycobacterium*、*Nocardia*、*Nocardioideis*、新草螺菌属 (*Noviherbaspirillum*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)、*Paenibacillus*、副球菌属 (*Paracoccus*)、土地杆菌属 (*Pedobacter*)、海藻球菌属 (*Phycococcus*)、*Promicromonospora*、*Pseudomonas*、*Pseudonocardia*、极小单胞菌属 (*Pusillimonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、

*Rhodococcus*、微红微菌属 (*Rubellimicrobium*)、*Saccharothrix*、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链孢子囊菌属 (*Streptosporangium*)、*Streptomyces*、*Terrabacter*、冢村菌属 (*Tsukamurella*) 和贪噬菌属 (*Variovorax*)。开花结果期共分离到 45 个属, 包括 *Achromobacter*、农霉菌属 (*Agromyces*)、*Amycolatopsis*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Bosea*、*Brevibacillus*、*Brevibacterium*、*Brevundimonas*、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、戴氏菌属 (*Dyella*)、剑菌属 (*Ensifer*)、弯杆菌属 (*Flexivirga*)、糖霉菌属 (*Glycomyces*)、*Gordonia*、居土杆菌属 (*Humibacter*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、*Kribbella*、考克氏菌属 (*Kocuria*)、诺尔氏菌属 (*Knoellia*)、赖氏菌属 (*Leifsonia*)、*Lysobacter*、中生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、*Methylobacterium*、*Microbacterium*、微球菌属 (*Micrococcus*)、小月菌属 (*Microlunatus*)、尼阿巴菌属 (*Niabella*)、*Nocardia*、*Nocardioideis*、*Noviherbaspirillum*、*Ochrobactrum*、*Paenibacillus*、污泥单胞菌属 (*Pelomonas*)、*Phycococcus*、*Pseudomonas*、*Pseudonocardia*、罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia*)、*Rhizobium*、*Rhodanobacter*、*Rhodococcus*、鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*)、*Streptomyces*、*Terrabacter* 和 *Variovorax*。采摘期共分离到 18 个属, 包括: *Agrococcus*、交替红色杆菌属 (*Altererythrobacter*)、*Arthrobacter*、*Bacillus*、



*Brevibacillus*、*Brevundimonas*、*Lentzea*、*Massilia*、*Microbacterium*、*Micrococcus*、*Nocardioides*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas*、*Rhodococcus*、*Sphingobium*、*Streptomyces*、*Terrabacter* 和朴氏杆菌属(*Yonghaparkia*)。从不同时期及原始土分离菌属 Venn 图(图 2)可以看出,共有的类群有 7 个,占 9.1%,分别为 *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Microbacterium*、*Nocardioides*、*Rhodococcus*、*Streptomyces* 和 *Terrabacter*。这些物种是土壤的土著菌,具有极强的适应能力,对烤烟植物具有重要的生物活性,在烤烟种植不同时期都能检测到。据报道 *Arthrobacter* 是著名的尼古丁降解菌株,能够促进烤烟植物生长及增强植物的抗性<sup>[17-18]</sup>。*Bacillus* 具有丰富的酶活特性,能够增强烤烟对青枯病的抗性<sup>[19-20]</sup>。*Microbacterium* 能够降解复杂有机质,同时在降解土壤中不溶钾为可溶钾方面具有优势<sup>[21]</sup>。*Nocardioides* 具有一定的降解尼古丁的能力,其相关酶可用于尼古丁检测试剂盒的开发<sup>[22-23]</sup>。*Streptomyces* 不仅能够促进烤烟的生长,而且能增强烤烟的抗病性,对于烤烟致病菌具有较强的拮抗作用<sup>[24-25]</sup>。*Rhodococcus* 具有降解复合及有毒化合物的能力,同时在降解尼古丁方面具有优势<sup>[26]</sup>。*Terrabacter* 能够降解复杂的化合物,具备降解二噁英、邻苯二甲酸酯的能力,在减少烤烟有害物质方面具有优势,其功能基因在烤烟植物的基因改造方面具有重要应用前景<sup>[27-28]</sup>。

不同生长时期烤烟根际土细菌共有物种除以上 7 个之外还有 3 个(3.9%),分别为 *Brevibacillus*、*Brevundimonas*、*Pseudomonas*。这 3 个类群只在 3 个生长时期的烤烟根际土中分离到,却未在原始土中检测到,说明这 3 个类群与烤烟种植关系密切。研究表明, *Brevibacillus* 在皮革污染水中对重金属六价铬具有明显的生物还原作用<sup>[29]</sup>,能够增强烤烟抗性<sup>[30]</sup>、促进烤烟生长<sup>[31]</sup>; *Brevundimonas* 具有极强的降解功能,可降解土壤中残存的农药及毒素维护根际健康土壤环境<sup>[32]</sup>,能够降解尼古丁减少烤烟根际及植物的尼古丁含量<sup>[33]</sup>; *Pseudomonas* 是著名的生防菌,具有降解尼古丁特性<sup>[34]</sup>,能够促进烤烟植物生长同时

增强烤烟对各种病害的抗性,降低烤烟中重金属含量<sup>[35-36]</sup>。

蕾薹期特有类群有 13 个,占 16.9%,分别为 *Acidovorax*、*Advenella*、*Brachybacterium*、*Devosia*、*Herbaspirillum*、*Paracoccus*、*Pedobacter*、*Pusillimonas*、*Rubellimicrobium*、*Stenotrophomonas*、*Staphylococcus*、*Streptosporangium* 和 *Tsukamurella*。开花结果期特有类群有 16 个,占 20.8%,分别为 *Burkholderia*、*Dyella*、*Ensifer*、*Flexivirga*、*Glycomyces*、*Kitasatospora*、*Knoellia*、*Kocuria*、*Leifsonia*、*Mesorhizobium*、*Micrococcus*、*Microtholatus*、*Niabella*、*Pelomonas*、*Ralstonia* 和 *Sphingopyxis*。采摘期特有类群有 5 个,占 6.5%,分别为: *Paenibacillus*、*Yonghaparkia*、*Micrococcus*、*Altererythrobacter* 和 *Sphingobium*。原始土特有类群有 5 个,占 6.5%,分别为 *Actinotalea*、*Chryseobacterium*、*Enterobacter*、*Microvirga* 和 *Sphingobacterium*。蕾薹期与原始土共有菌属数目为 21 个,开花结果期与原始土共有菌属数目为 18 个,采摘期与原始土共有菌属数目为 8 个,共有类群逐渐减少,说明随着烤烟种植时间的增长,原土著菌群种类逐渐减少,烤烟植物种植对于根际微生物具有一定的抑制作用。

从与烤烟植物密切的 10 个属中挑选出 62 个不同种的代表菌株,对其相应的烟碱利用、溶磷效果、固氮作用、Cr<sup>6+</sup>耐受、产铁载体及淀粉水解作用进行检测<sup>[13]</sup>,结果如表 5 所示。绝大多数菌株都

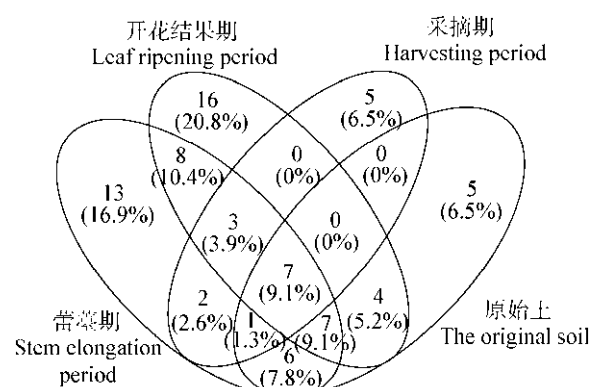


图 2 不同时期土壤检测菌属 Venn 图

Figure 2 Venn diagram of detected soil bacteria at different periods of tobacco growth



表 5 菌号、最接近种属、相似性及部分生物学特性检测结果

Table 5 Strains, the closest type strains with the highest 16S rRNA gene sequence similarities and their biological trait results

菌号 Strain No.	相似菌株 Closest homolog	相似度 Similarity (%)	烟碱利用 Nicotine utilization	溶磷效果 Phosphate solubilizing	固氮 Nitrogen fixation	Cr <sup>6+</sup> 耐受 Cr <sup>6+</sup> tolerance	产铁载体 Siderophores production	淀粉水解 Amylase activity
Y 7776	<i>Arthrobacter defluvii</i>	99.86	+++	+	—	—	+++	++
Y 7362	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	+	+	+	++	++	—
Y 7650	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	99.62	—	+	+	+	+	++
Y 6038	<i>Bacillus aerophilus</i>	100	+++	+	—	+	+	—
Y 7464	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100	+++	++	+	+	+	++
Y 6008	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100	+++	+	++	+	+	+
Y 6051	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100	+++	++	—	+	+	++
Y 6046	<i>Bacillus circulans</i>	98.66	—	—	—	+	+	+
Y 7780	<i>Bacillus drentensis</i>	100	—	+	—	—	+	—
Y 7690	<i>Bacillus ginsengihumi</i>	99.87	+++	+++	—	—	+	—
Y 7621	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.82	+++	++	+	+	++	—
Y 6005	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99.86	+++	+++	—	—	+	++
Y 6049	<i>Bacillus safensis</i>	100	+++	—	—	+	++	—
Y 6093	<i>Bacillus simplex</i>	100	—	—	—	+	—	—
Y 7405	<i>Bacillus stratosphericus</i>	100	+++	—	—	+	++	—
Y 7848	<i>Bacillus tequilensis</i>	99.71	+++	++	—	++	++	++
Y 7501	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	97.50	++	—	—	—	—	—
Y 7478	<i>Brevundimonas alba</i>	99.73	+++	+++	—	—	+	—
Y 5526	<i>Brevundimonas diminuta</i>	99.85	++	—	—	—	+	—
Y 7794	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	99.30	—	—	+	—	+	+
Y 7510	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	99.54	++	+++	—	—	—	—
Y 7541	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>	99.59	—	—	—	+	+	—
Y 7322	<i>Nocardioideis aromaticivorans</i>	100	+	—	+	+	+	—
Y 7524	<i>Nocardioideis furvisabuli</i>	96.81	—	+	—	—	+	++
Y 7609	<i>Nocardioideis ganghwensis</i>	97.20	+	—	—	—	—	—
Y 7572	<i>Nocardioideis kongjuensis</i>	99.53	+	++	+	+	+	—
Y 7654	<i>Nocardioideis luteus</i>	100	—	—	—	—	—	++
Y 7849	<i>Nocardioideis nitrophenolicus</i>	99.40	—	+	+	++	+	—
Y 7686	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	99.73	+	++	++	++	++	—
Y 7297	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	+++	++	+	++	+	—
Y 7940	<i>Pseudomonas geniculata</i>	100	++	—	—	+	++	—

(待续)

(续表 5)

Y 5502	<i>Pseudomonas geniculata</i>	100	+++	—	—	—	+	—
Y 7886	<i>Rhodococcus marionascens</i>	99.07	+	+	++	++	+	—
Y 7882	<i>Rhodococcus opacus</i>	99.54	++	—	+	+	++	+
Y 7160	<i>Rhodococcus ruber</i>	100	—	—	++	++	+	—
Y 7720	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	99.08	++	—	+	++	+	+
Y 7709	<i>Streptomyces anthocyanicus</i>	100	+++	—	—	++	—	+
Y 7303	<i>Streptomyces aomiensis</i>	99.35	+	—	+	++	—	++
Y 7878	<i>Streptomyces canus</i>	100	+	+	—	—	—	—
Y 7753	<i>Streptomyces cellulosae</i>	100	—	—	—	—	—	+++
Y 7136	<i>Streptomyces chartreusis</i>	100	—	—	—	+	+	—
Y 7580	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	100	—	+	+	+++	+	++
Y 7258	<i>Streptomyces coacervatus</i>	98.46	—	+	+	+++	—	++
Y 7655	<i>Streptomyces coelestis</i>	100	+++	+	+	++	—	+
Y 7479	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	99.52	++	++	+	+	—	++
Y 7558	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99.08	+	+	—	+++	+	+
Y 7483	<i>Streptomyces durmitorensis</i>	100	+++	+	+	+	—	+
Y 7367	<i>Streptomyces filipinensis</i>	98.46	++	++	+	+	—	++
Y 7474	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	99.47	++	+	+	++	—	+
Y 6050	<i>Streptomyces griseolus</i>	100	—	—	—	+	—	—
Y 7506	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	100	—	—	—	+++	—	++
Y 7577	<i>Streptomyces humidus</i>	99.48	—	+	—	+	—	—
Y 7255	<i>Streptomyces longisporus</i>	99.69	+	—	+	—	—	—
Y 7273	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	100	—	—	+	—	—	++
Y 7218	<i>Streptomyces polychromogenes</i>	99.54	—	—	—	—	—	+
Y 7407	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	98.59	+++	—	+	++	+	+
Y 7550	<i>Streptomyces shaanxiensis</i>	98.55	+++	+	+	+	—	++
Y 7473	<i>Streptomyces sindenensis</i>	100	—	—	+	+	—	++
Y 7369	<i>Streptomyces tricolor</i>	100	++	—	++	+++	++	++
Y 7472	<i>Streptomyces vinaceus</i>	100	—	—	—	++	—	++
Y 7704	<i>Streptomyces violarius</i>	99.84	—	—	++	++	+	+
Y 7652	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	100	+++	—	+	++	+	+
Y 7466	<i>Terrabacter terrigena</i>	99.85	—	—	—	—	—	++
Y 7343	<i>Terrabacter tumescens</i>	99.45	—	—	—	—	—	++

注: +: 生长或半径比值小于 1; ++: 长势较好或半径比值大于 1 小于 2; +++: 长势好或半径比值大于 2; —: 不生长或无活性。

Note: +: Growth or radius ratio less than 1; ++: Growth better or radius ratio greater than 1 less than 2; +++: Growth very well or radius ratio greater than 2; —: Without growth or activity.

能够耐受烟碱及  $\text{Cr}^{6+}$ ，对于降低烤烟植物尼古丁含量及转化  $\text{Cr}^{6+}$  离子方面具有优势；具有较好的溶磷、产铁载体和固氮特性，对于土壤营养成分调节及促进植物生长具有一定的潜力。云南特殊的气候及地理特征，使得云南烤烟中的淀粉含量较高，影响口感。根际微生物是植物内生菌的主要来源，一些具有解淀粉特性的根际微生物可以进入植物内部，降低植物淀粉含量。

2.6 香农指数多样性分析

蕾薹期、开花结果期、采摘期不同种植模式下根际土细菌香农、辛普森指数计算结果如表 6 所示。

微生物的多样性对于土壤质量的评价具有重要作用，微生物多样性增加能够维持健康的土壤微环境，抑制有害微生物，促进植物生长及增强植物的抗病性<sup>[8-9]</sup>。相对于其他烤烟类型来说，烤烟 K326 在植物品系上更有利于根际微生物多

样性的维持<sup>[10]</sup>。烤烟植物的种植，由于根际分泌的化学物质的影响，使得根际微生物的种群分布及数量发生一定的变化，耕种烤烟或烤烟与香料植物间作之后，会影响土壤细菌的多样性。实验结果显示，蕾薹期香农指数变化为：W (4.079 191 7)>2GAY (3.840 352 1)>2GDY (3.514 562 8)>2GCKY (3.497 703 4)>2GBY (3.447 478 9)>2GCY (3.253 409 2)>2GEY (3.241 103 4)。原始土 W 由于在种植植物之前是统一培育的配比水肥适当的健康土壤，其细菌的多样性较高。植物根际的分泌物能够影响根际微生物的种类、数量和结构组成，对根际微生物群落结构的变化具有重要影响<sup>[37]</sup>。烤烟有非常严重的连作障碍，主要的原因是根际分泌物对土壤微生物具有一定的抑制作用，使得根际微生物的多样性减少，所以种植烤烟之后，根际细菌的多样性有所减少，选择间作的耕作方式能够缓解这种不利影响<sup>[8-9]</sup>。种植不同模式的烤烟植物之后，植物与植物的相互作用会使植物根

表 6 3 个不同生长时期不同样点的香农、辛普森指数

Table 6 The Shannon and Simpson index of different samples at three different growing period

样点 Samples	菌株数 Number of strains	OTU 数 Number of OTUs	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
W	117	71	4.079 191 7	0.978 888 2
2GCKY	56	38	3.497 703 4	0.964 285 7
2GAY	90	57	3.840 352 1	0.972 345 7
2GBY	50	35	3.447 478 9	0.964 000 0
2GCY	51	33	3.253 409 2	0.949 634 8
2GDY	47	37	3.514 562 8	0.966 048 0
2GEY	43	29	3.241 103 4	0.955 110 9
3GCKY	56	37	3.442 125 1	0.959 821 4
3GAY	53	43	3.688 981 7	0.972 588 1
3GBY	48	33	3.353 155 8	0.958 333 3
3GCY	43	30	3.305 582 2	0.959 437 5
3GDY	56	34	3.349 171 9	0.957 908 2
3GEY	48	33	3.306 294 5	0.955 729 2
5GCKY	12	10	2.210 253 6	0.875 000 0
5GAY	11	10	2.271 868 5	0.892 562 0
5GBY	13	12	2.458 311 3	0.911 242 6
5GCY	8	8	2.079 441 5	0.875 000 0
5GDY	2	2	0.693 147 2	0.500 000 0
5GEY	20	18	2.857 102 8	0.940 000 0

际微环境产生变化,使原始土壤中的菌群结构发生相应变化。具体表现在与单作烤烟相比,香叶天竺葵间作烤烟及迷迭香间作烤烟微生物的多样性指数较高,说明这两种间作模式对于蕾薹期烤烟根际土细菌多样性维持效果较好;而甜罗勒间作烤烟及薄荷间作烤烟,其根际土细菌的多样性较低,可能是这两种间作模式对烤烟植物根际微生态影响较大,导致细菌的种类及数量发生较大变化。

开花结果期烤烟植物的生长状态稳定,其根际的微环境也趋于稳定,不同间作模式下烤烟根际土细菌多样性发生一定变化,香农指数变化为: 3GAY (3.688 981 7)>3GCKY (3.442 125 1)>3GBY (3.353 155 8)>3GDY (3.349 171 9)>3GEY (3.306 294 5)>3GCY (3.305 582 2),结合辛普森指数来看,香茅草间作、迷迭香间作、薄荷间作及甜罗勒间作模式根际土分离到的微生物其均一性较单作烤烟要好。香茅草单作烤烟在开花结果期,其香农指数较蕾薹期有所下降。开花结果期香叶天竺葵间作烤烟的细菌香农指数最高,其次是烤烟单作、香茅草间作、迷迭香间作、薄荷间作及甜罗勒间作类型;香叶天竺葵间作、烤烟单作、香茅草间作、迷迭香间作类型烤烟根际土细菌香农指数都较蕾薹期有所降低,薄荷间作及甜罗勒间作类群根际土细菌香农指数较蕾薹期有所增加,可能开花结果期不同耕作类型根际土的微环境较蕾薹期有较大变化,使得同样培养条件下分离到的细菌多样性发生变化。

采摘期烤烟植物的生长状态欠佳,根际微环境也发生一定的变化,不利于烤烟根际微生物的生长,从采摘期单作烤烟的根际土细菌香农指数即可看出,相对于蕾薹期及开花结果期,所有间作及单作烤烟根际土细菌的多样性变差。不同的间作模式下烤烟根际土细菌的香农指数变化为: 5GEY (2.857 102 8)>5GBY (2.458 311 3)>5GAY (2.271 868 5)>5GCKY (2.210 253 6)>5GCY (2.079 441 5)>5GDY (0.693 147 2)。薄荷间作烤烟

采摘期根际土的细菌香农指数最高,说明其根际土细菌多样性较高,土壤生态环境维持较好。综合比较不同时期烤烟根际细菌多样性及纯培养分离结果,从微生物多样性角度分析,薄荷间作类型在缓解烤烟连作障碍方面具有优势,其次是香茅草与烤烟间作及香叶天竺葵烤烟间作类型。

### 3 讨论与结论

用纯培养的手段从不同生长时期的各间作烤烟根际土中共获得 707 株细菌,分布于 70 个属。大量根际细菌类群的获得对后续针对筛选烤烟种植及后期加工过程中具有各种酶活作用的微生物资源具有重要意义。与烤烟种植关系密切的微生物有 10 个属,分别为 *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Brevundimonas*、*Microbacterium*、*Nocardioides*、*Pseudomonas*、*Rhodococcus*、*Streptomyces* 和 *Terrabacter*, 具有重要的生物学特性。

蕾薹期和开花结果期分离到的细菌数量及种类较多,但是采摘期的细菌数量及种类减少明显,说明土壤中的细菌数量会随着植物生长时期的改变而发生一定变化。采摘期细菌的数量锐减,说明土壤微环境不利于细菌的生长。蕾薹期和开花结果期烤烟根际土细菌的多样性指数明显高于采摘期单作烤烟。薄荷、迷迭香、香茅草间作烤烟根际土细菌多样性在蕾薹期、开花结果期、采摘期都较高,尤其是在采摘期依然能够保持较高的细菌多样性,对于维持土壤微生物多样性、缓解烤烟连作障碍具有明显优势。

### REFERENCES

- [1] Li Q, Niu LL, Liu Y, et al. Research progress on application of microbial agents in modern tobacco production[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(7): 68-72 (in Chinese)  
李倩, 牛莉莉, 刘园, 等. 微生物制剂在现代烟草生产中的应用研究进展[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(7): 68-72
- [2] Wang Z, Ao JC, Zhang Z, et al. Effects of different microbial fertilizer on growth and development and quality of flue-cured tobacco[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(10): 79-82,87 (in Chinese)

- 王政, 敖金成, 张真, 等. 微生物菌肥对烤烟生长发育和品质的影响[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(10): 79-82, 87
- [3] Liu XL, Wang C, Wu F, et al. Studies on tobacco rhizosphere microbes[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(2): 552-557 (in Chinese)  
刘训理, 王超, 吴凡, 等. 烟草根际微生物研究[J]. 生态学报, 2006, 26(2): 552-557
- [4] Gu JG, Fang DH, Li TF, et al. Isolation of tobacco rhizobacteria and their antagonism to *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2001, 7(3): 19-22, 45 (in Chinese)  
顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 防治烟草黑胫病的根际细菌分离与筛选[J]. 中国烟草学报, 2001, 7(3): 19-22, 45
- [5] Liu X, Kong FY, Zhang CX, et al. Isolation and identification of the potassium-releasing bacteria from tobacco rhizosphere[J]. Chinese Tobacco Science, 2012, 33(3): 28-31 (in Chinese)  
刘璇, 孔凡玉, 张成省, 等. 烟草根际解钾菌的筛选与鉴定[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(3): 28-31
- [6] He C, Liu GS, Jiang SJ. Effect of continuous cropping on tobacco soil microorganism community diversity[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(4): 658-663 (in Chinese)  
何川, 刘国顺, 蒋士君. 连作对植烟土壤微生物群落多样性的影响[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(4): 658-663
- [7] Yue BB, Li X, Zhang HH, et al. Soil microbial diversity and community structure under continuous tobacco cropping[J]. Soils, 2013, 45(1): 116-119 (in Chinese)  
岳冰冰, 李鑫, 张会慧, 等. 连作对黑龙江烤烟土壤微生物功能多样性的影响[J]. 土壤, 2013, 45(1): 116-119
- [8] Wei J, Yang HW, Xu ZL, et al. Effects of different intercropping patterns on rhizosphere soil bacteria colony characteristics and flue-cured tobacco yield and quality[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(4): 601-608 (in Chinese)  
韦俊, 杨焕文, 徐照丽, 等. 不同烤烟套作模式对烤烟根际土壤细菌群落特征及烤烟产质量的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(4): 601-608
- [9] Xiang QS, Zhong YL, Peng J, et al. Agro-biodiversity controls tobacco pests[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(2): 208-211 (in Chinese)  
向青松, 钟亚霖, 彭军, 等. 农业生物多样性控制烟草病虫害[J]. 中国农学通报, 2010, 26(2): 208-211
- [10] Li Q, Sun JZ, Pi BY, et al. Study on microbial community structure and diversity in rhizosphere of different flue-cured tobacco[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(30): 160-163 (in Chinese)
- 李强, 孙敬钊, 皮本阳, 等. 不同品种烤烟根际微生物群落结构及多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(30): 160-163
- [11] Peng S, Chen X, Yang Y, et al. The preliminary study on effect of intercropping tobacco with aromatic plants on agronomic and economic characters[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2014, 29(1): 144-148 (in Chinese)  
彭晟, 陈兴, 杨莹, 等. 间作芳香植物对烤烟农艺和经济性状的影响初探[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(1): 144-148
- [12] Zhang YJ, Liu GS, Ye XF, et al. Changes of soil enzyme activities and microorganism amounts at different growing stages of flue-cured tobacco[J]. Soils, 2010, 42(1): 39-44 (in Chinese)  
张友杰, 刘国顺, 叶协锋, 等. 烤烟不同生育期土壤酶及微生物活性的变化[J]. 土壤, 2010, 42(1): 39-44
- [13] Liu BB. The diversity and functional enzymes screening of prokaryotes in intercropping systems of tobacco with aromatic plants[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
刘冰冰. 烤烟 K326 与香料植物间作下原核微生物多样性及部分菌株功能酶筛选研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2014
- [14] Chen W, Yang Y, Chen X, et al. Study on biodiversity and functional enzymes of tobacco K326 endophytes in most productive growth period[J]. Journal of Yunnan University, 2013, 35(6): 874-884 (in Chinese)  
陈微, 杨莹, 陈兴, 等. 旺长期烤烟 K326 内生细菌多样性及部分菌株的酶活筛选[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(6): 874-884
- [15] Rees HC, Grant WD, Jones BE, et al. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods[J]. Extremophiles, 2004, 8(1): 63-71
- [16] Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2014, <http://www.R-project.org/>
- [17] Ma GH, Lei LP, Xia ZY, et al. Diversity and phylogenetic analyses of nicotine-degrading bacteria isolated from tobacco plantation soils[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(34): 6392-6398
- [18] Wu K, Yuan SF, Wang LL, et al. Effects of bio-organic fertilizer plus soil amendment on the control of tobacco bacterial wilt and composition of soil bacterial communities[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(6): 961-971
- [19] Yuan SF, Wang LL, Wu K, et al. Evaluation of bacillus-fortified organic fertilizer for controlling tobacco bacterial wilt in greenhouse and field experiments[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 75: 86-94
- [20] Wei Z, Yang XM, Yin SX, 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
- [21] Zhang CS, Kong FY. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 82: 18-25
- [22] Ganas P, Sachelaru P, Mihasan M, et al. Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614[J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 189(5): 511-517
- [23] Qiu JG, Zhang YT, Zhao LL, et al. Isolation and characterization of the cotinine-degrading bacterium *Nocardioides* sp. strain JQ2195[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 353: 158-165
- [24] Zhang L, Liu HB, Gu JG, et al. Effects of *Trichoderma longibrachitum* and *Streptomyces jingyangensis* combination on the growth and disease resistance of tobacco seedlings[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(10): 2961-2969 (in Chinese)  
张良, 刘好宝, 顾金刚, 等. 长柄木霉和泾阳链霉菌复配对烟苗生长及其抗病性的影响[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(10): 2961-2969
- [25] Ahsan T, Chen JG, Zhao XX, et al. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 54
- [26] Gong XW, Yang JK, Duan YQ, et al. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 200-204
- [27] Nojiri H, Kamakura M, Urata M, et al. Dioxin catabolic genes are dispersed on the *Terrabacter* sp. DBF63 genome[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 296(2): 233-240
- [28] Habe H, Miyakoshi M, Chung J, et al. Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(1): 44-54
- [29] Chatterjee S, Shekhawat K, Gupta N. Bioreduction of toxic hexavalent chromium by novel indigenous microbe *Brevibacillus agri* isolated from tannery wastewater[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2019, 16(7): 3549-3556
- [30] Jatoi GH, Guo LH, Yang XF, et al. A novel protein elicitor PeBL2, from *Brevibacillus laterosporus* A60, induces systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tobacco plant[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2019, 35(3): 208-218
- [31] Zhu ZB, Wu BQ, Ding YQ, et al. The growth-promoting effect and system resistance induction of *Brevibacillus brevis* DZQ3 to tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2012, 33(3): 92-96,106 (in Chinese)  
朱忠彬, 吴秉奇, 丁延芹, 等. 短短芽孢杆菌 DZQ3 对烟草的促生及系统抗性诱导作用[J]. *中国烟草科学*, 2012, 33(3): 92-96,106
- [32] Gu X, Liu YW, Wang XP, et al. Microbial remediation of chlorpyrifos by *Brevundimonas* sp. A1A18 in alkaline soil[J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2019, 28(1): 181-189 (in Chinese)  
顾欣, 刘艳薇, 王新谱, 等. 短波单胞菌(*Brevundimonas* sp.)A1A18 对碱性土壤毒死蜱污染的修复[J]. *生态环境学报*, 2019, 28(1): 181-189
- [33] Lei LP, Xia ZY, Liu XZ, et al. Occurrence and variability of tobacco rhizosphere and phyllosphere bacterial communities associated with nicotine biodegradation[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(1): 163-173
- [34] Liu YH, Rao YX, Xiao W, et al. Progress in nicotine biodegradation by *Pseudomonas* spp.[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2012, 40(11): 31-34,52 (in Chinese)  
刘杨惠, 尧宇翔, 肖吾, 等. 假单胞菌代谢尼古丁研究进展[J]. *广州化工*, 2012, 40(11): 31-34,52
- [35] Li BD. The study of the control effects of two biological control agents (*Paenibacillus polymyxa* and *Pseudomonas fluorescens*) on tobacco bacterial wilt[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2018 (in Chinese)  
李碧德. 两种生防菌(*Paenibacillus polymyxa* 与 *Pseudomonas fluorescens*)防控烟草青枯病的特性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018
- [36] Li J, Zheng BF, Hu RW, et al. *Pseudomonas* species isolated from tobacco seed promote root growth and reduce lead contents in *Nicotiana tabacum* K326[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(3): 214-223
- [37] Paterson E, Gebbing T, Abel C, et al. Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil[J]. *New Phytologist*, 2007, 173(3): 600-610