

# 灵芝连作障碍的土壤微生物种群特性 及其生物防治初探

马红梅, 李小兵, 符 浩, 符丽颜

(琼州学院 生物科学与技术学院, 海南 三亚 572000)

**摘要:** 以灵芝栽培 0(对照)、1、2、3 a 的土壤为研究对象, 采用选择性培养基分离计数三大主要微生物类群(细菌、放线菌和真菌)以及与灵芝生长繁殖密切相关的两大生理微生物类群(好气性纤维素分解菌、好气性自生固氮菌)。结果表明, 随着栽培年限的增加, 土壤中的微生物总数和细菌数量呈下降趋势, 放线菌数量波动较大, 先增加后减少; 细菌、放线菌数量占微生物总数比例逐渐降低, 真菌数量比例逐渐增加, 其中细菌占绝对优势(83.36%~94.21%), 放线菌次之(5.44%~15.04%), 真菌最少(0.35%~1.60%); 好气性纤维素分解菌和好气性自生固氮菌数量均逐渐减少, 尤其是栽培 2 a 后各类微生物的数量与对照的差异均达到极显著水平。由此可知, 连作使灵芝土壤微生物区系的结构和数量发生了改变。连作土壤中分离鉴定出 6 个菌属的优势细菌, 分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、短杆菌属(*Brevibacterium*); 2 个菌属的优势放线菌, 分别为链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*), 其中 *Streptomyces* 种类较多, 有灰色类群、黄色类群、蓝色类群、白色类群、淡紫灰类群; 6 个菌属的优势真菌, 分别为: 木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉(*Mucous*)、链孢霉属(*Neurospora*)、根霉(*Rhizopus*)。将分离的菌种制成发酵素, 分别加入到按正交试验设计进行组合的发酵原料中, 当覆土层中发酵原料紫檀木屑、枫树木屑、椰糠椰壳、玉米秸秆与连作 2 a 的土壤按 1:2:2:2:2 的比例加入时, 灵芝增产率最高。

**关键词:** 灵芝; 连作障碍; 土壤微生物种群; 生物防治

中图分类号: S158 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0053-06

## Preliminary Study on Microflora of *Ganoderma lucidum* Continuous Cropping Obstacle Soil and Its Biological Control

MA Hong-mei, LI Xiao-bing, FU Hao, FU Li-yan

(College of Bioscience and Technology, Qiongzhou College, Sanya 572000, China)

**Abstract:** Soil samples with cropping *Ganoderma lucidum* for 0, 1, 2, 3 years were used as materials to study variation of soil microflora. Three main microorganisms(bacteria, actinomycetes and fungi) and two main physiological groups(cellulose decomposing microorganisms and azotobacter) which were closely associated with growth of *Ganoderma lucidum*, were isolated and counted with corresponding selective media. The results showed with the increase of cultivation years, the number of total microbes and bacteria deceased, actinomycetes fluctuated greatly, first increased and then decreased; the proportion of bacteria and actinomycetes gradually decreased, while the

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 海南省教育厅资助项目(Hjkj2012-40); 琼州学院青年科研基金(QYQN201239); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201311100038); 三亚重点实验室项目(L1210)

作者简介: 马红梅(1976-), 女, 安徽芜湖人, 副教授, 硕士, 主要从事应用微生物及食用菌方面的教研工作。

E-mail: mahongmei612@163.com

proportion of fungi gradually increased, bacteria assumed absolute superiority (83.36%—94.21%), actinomycetes came second (5.44%—15.04%) and fungi took the least (0.35%—1.60%); the number of aerobic cellulose decomposing microorganisms and azotobacter gradually decreased. Therefore, continuous cropping changed the microflora structure and quantity in soil. In continuous cropping soil, six dominant bacterial genera were isolated from cropping soil with *Ganoderma lucidum*, and identified as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*; two dominant actinomycete genera were isolated and identified as *Streptomyces* and *Micromonospora*, among which *Streptomyces* had more species, there were gray group, yellow group, blue group, white group and lavender group; six dominant fungus genera were isolated and identified as *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucous*, *Neurospora*, *Rhizopus*. Straw formulation of different materials were combined according to the orthogonal design. Results indicated when the rosewood sawdust, maple sawdust, coconut shell, corn straw and continuous two-year cropping soil were mixed at 1:2:2:2:2, the rate of *Ganoderma lucidum* production could be maximum.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; continuous cropping obstacle; soil microflora; biological control

连作障碍是指同一作物或近缘作物连作以后,即使在正常栽培管理的情况下,也会出现产量降低、品质变劣、生育状况变差的现象。灵芝作为一种药食兼用的珍贵药材,市场开发前景广阔,并逐渐受到重视。然而灵芝大棚脱袋栽培 2~3 a 就会出现出菇缓慢、菇体变小、畸形、病虫害加重等现象,加强卫生管理后,症状减轻,但产量极不稳定。灵芝连作障碍现象在灵芝种植地非常普遍。通过培养料配方的筛选<sup>[1]</sup>、栽培品种的选择<sup>[2]</sup>、加强栽培环境管理等措施提高灵芝产量和质量<sup>[3]</sup>,其效果不理想。个体种植户和公司因不能认识灵芝连作障碍的机制,导致防治措施不得力。在灵芝覆土栽培过程中,土壤微生物是灵芝生长发育过程中的重要参与者,也是土壤肥力的重要评价指标之一。随着土壤中养分的转化与吸收,土壤中微生物区系的组成和数量会发生一定的改变<sup>[4]</sup>。土壤中三大类群微生物区系比例是土壤肥力的一个衡量指标,土壤中细菌、放线菌密度高,表明土壤肥力水平较高。因此,研究灵芝土壤微生物区系的变化规律对解决灵芝连作障碍具有重要的实践和理论意义。为此,本研究对灵芝不同栽培年限土壤中的微生物进行分离、鉴定,以期从土壤微生物角度研究灵芝连作障碍的形成机制,并探讨了其生物防治措施,为消除灵芝连作障碍、保持灵芝种植业持续稳定发展提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 土样 供试土样为海南南圣灵芝基地栽培灵芝年限为 0、1、2、3 a 的土壤,分别设为对照、处理 1、处理 2、处理 3,采样深度 0~5 cm。将采集的新鲜土样装入无菌玻璃瓶内,置于 4℃ 冰箱,当天准备分离。

1.1.2 培养基 细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌培养采用孟加拉红培养基,放线菌培养采用改良高氏一号培养基,好气性纤维素分解菌培养采用赫奇逊培养基,好气性自生固氮菌培养采用阿须贝培养基。

### 1.2 微生物分离与计数

参照文献[5-8]中的方法对土壤中的细菌、真菌、放线菌三大微生物类群以及与灵芝生长繁殖有很大关联的好气性纤维素分解菌、好气性自生固氮菌两大微生物生理类群进行分离培养。称取 10 g 土样,放入盛有 90 mL 无菌水的带有玻璃珠的三角瓶中,置于快速混匀器上振荡摇匀 20 min,使土和水充分混合,即得  $10^{-1}$  土壤悬浮液;振荡  $10^{-1}$  土壤悬浮液,在沉降前吸取 10 mL 加入到另一个装有 90 mL 无菌水的三角瓶中振荡摇匀,即得  $10^{-2}$  土壤悬浮液,以此类推,最后稀释获得  $10^{-6}$  土壤悬浮液。根据所分离的微生物种类,吸取不同稀释度的土壤悬浮液(真菌  $10^{-4}$ 、细菌  $10^{-6}$ 、放线菌  $10^{-4}$ ) 0.5 mL 于无菌培养皿中,倒入已融化并冷却至 45℃ 左右的相应培养基,每个稀释度 3 个重复,摇匀凝固后倒置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 2~3 d 观察记录培养皿中的细菌菌落数目,5 d 观察真菌菌落数目,7 d 观察放线菌菌落数目,10 d 观察好气性纤维素分解菌和好气性自生固氮菌菌落数目。另称取 10 g 土样,105℃ 烘至恒质量,得到土样干质量。

### 1.3 优势微生物种群的鉴定

优势细菌:纯化后观察优势细菌菌落形态,采用革兰氏染色观察菌体个体形态,生理生化试验及分类参考文献[9]。优势放线菌:观察纯化培养后的优势放线菌菌落形态,并采用插片培养后石炭酸复红染色进行镜检,观察菌体个体形态,其分类主要参考

文献[10-11]。优势真菌:培养后直接观察优势真菌菌落形态,并用乳酸石炭酸溶液染色后观察个体形态,其分类主要参考文献[12-13]。

1.4 连作土壤的生物防治

1.4.1 原料 将紫檀木(A)、枫树木(B)、椰糠椰壳(C)、玉米秸秆(D)原料切段粉碎后与少量海南鸡粪混合。

1.4.2 堆肥发酵 挖深沟,在沟底垫塑料薄膜。将选用的发酵原料混合后倒入坑中,加水闷一夜,将分离到的菌种制成发酵素,然后加水稀释,按 1:20 的比例加入发酵原料中,铁锹搅拌菌剂时按由少到多的原则,先将菌种稀释液倒入少量发酵原料中搅拌均匀,然后再将搅拌好的少量发酵原料倒入剩余发酵原料中搅拌均匀,直到没有团块,加水量以发酵原料用手捏指缝间出水但不滴水为宜。拌入适量的尿素和过磷酸钙。上面用树枝稻草石头压实,盖上塑料薄膜密封,每 7 d 翻堆 1 次,自然温度(白天 35℃左右,夜间 25℃左右)发酵 30~35 d,直到没有臭味、出现白色放线菌丝为止。

1.4.3 覆土栽培 将连作 2 a 的土地翻耕暴晒,挖沟槽,并将栽培 2 a 的深翻暴晒土壤与不同配方的发酵原料按不同体积比进行混合拌匀,发酵原料与土壤(S)的配比见表 1,以灵芝菌体产量为评价指标。灵芝脱袋后埋入沟槽内,铺上上述处理的土壤,覆盖层厚度为 1.5~2.5 cm。按灵芝常规出菇管理进行管理,观察记录灵芝菌体的产量,计算增产率。  
增产率=(各处理组平均产量-对照组平均产量)/对照组平均产量×100%。

表 1 发酵原料配方正交试验设计

水平	因素			
	A:S	B:S	C:S	D:S
1	1:1	1:1	1:1	1:1
2	1:2	1:2	1:2	1:2
3	1:3	1:3	1:3	1:3

1.5 数据处理

数据采用 ORIGIN 8.5 和 SPSS 19.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 栽培年限对灵芝种植地土壤三大微生物类群的影响

细菌、放线菌和真菌是土壤微生物的三大类群,它们的区系组成和数量变化是土壤微生物研究中的重要领域,能反映土壤生物活性水平。由表 2 可知,随着栽培年限的增加,土壤微生物总数逐渐下降,其中对照土壤微生物总数与处理 1 无显著差异,与处理 2、3 差异极显著;土壤细菌数量变化趋势与微生物总数变化趋势基本一致,其中处理 1 土壤细菌数量与对照无显著差异,但处理 2 与处理 3 之间差异显著,且与对照差异极显著;土壤放线菌数量变化波动较大,随着栽培年限的增加先增加后减小,处理 1 土壤放线菌数量最大,与其他处理差异极显著,且处理 2、3 极显著高于对照;真菌数量随栽培年限增加而增加,处理 1 土壤真菌数量与对照无显著差异,但处理 2、3 与对照差异极显著。

表 2 不同栽培年限土壤中三大微生物类群的数量 ×10<sup>4</sup> cfu/g

处理	微生物	细菌	放线菌	真菌
对照	594.4±28.1aA	560.0±26.5aA	32.3±3.2cC	2.1±0.3cC
1	580.4±19.4aA	496.7±25.2aAB	81.3±6.0aA	2.4±0.4cC
2	455.5±58.9bB	396.7±58.6bB	55.3±9.1bB	3.5±0.3bB
3	336.5±51.6cC	280.5±36.5cC	50.6±6.5bB	5.4±0.4aA

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05),不同大写字母表示差异极显著(P<0.01),下同。

从图 1 可以看出,三大微生物类群以细菌数量最大,为 83.36%~94.21%;放线菌次之,为 5.44%~15.04%;真菌最少,为 0.35%~1.60%。随着栽培年限的增加,细菌在土壤微生物中所占比例逐年下降,放线菌变化没有规律,真菌逐年增加。有学者认为,土壤中三大类群微生物区系比例是土壤肥力的一个衡量指标,土壤中细菌、放线菌密度高,表明土壤肥力水平较高<sup>[14]</sup>,由此可知,灵芝栽培土壤肥力逐渐降低。

真菌是参与土壤有机质分解和腐殖质合成的主要成员之一,在土壤碳素和能源循环中起重要作用,

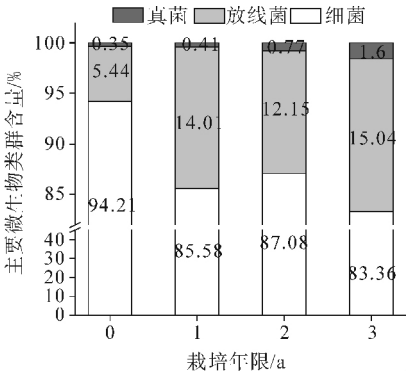


图 1 三大主要微生物类群数量在微生物总数中所占百分比

直接影响土壤肥力,但真菌中很多种类对作物具有致病性,与作物的土传病害的发生密切相关<sup>[15]</sup>。土壤中的病原真菌与灵芝争夺营养,从而影响灵芝的产量和品质,另外真菌数量逐年增加表明灵芝连作实际有效营养逐年减少,病虫害增加,这与生产连作症状表现一致。

## 2.2 栽培年限对灵芝种植地土壤主要微生物生理类群的影响

分离所得好气性自生固氮菌的菌落微微凸起,表面光滑或具有皱纹,有比较浓的黏液,一般初期为无色透明,以后为乳白色,最后变成褐色。好气性纤维素分解菌包括细菌、放线菌和真菌,菌落形态各异,有絮状、粉末状等,颜色大多为褐色、黄色、白色、绿色、黑色,平展,滤纸变薄。

由表 3 可以看出,随着栽培年限的增加,两大生理微生物类群的数量逐渐减少,但好气性纤维素分解菌数量变化相对较大。处理 1、2、3 土壤纤维素分解菌数量均与对照差异极显著,处理 1 与处理 2、3 差异显著,但处理 2 与处理 3 差异不显著;对照好气性自生固氮菌数量与处理 1 差异显著,与处理 2、3 差异极显著,处理 1、2、3 之间差异不显著。

表 3 不同栽培年限土壤中主要微生物生理类群的数量  $\times 10^3$  cfu/g

处理	好气性纤维素分解菌	好气性自生固氮菌
对照	9.0 $\pm$ 0.5aA	7.2 $\pm$ 0.5aA
1	5.0 $\pm$ 0.4bB	5.7 $\pm$ 0.7bAB
2	4.0 $\pm$ 0.3cB	5.1 $\pm$ 0.4bB
3	3.8 $\pm$ 0.4cB	4.5 $\pm$ 0.5bB

## 2.3 不同栽培年限灵芝土壤优势微生物种群的分析

稀释度最高时,菌落数占总菌落数的比例为 10% 以上的菌称之为优势菌群<sup>[16]</sup>。根据优势菌的定义,土壤中共分离出 6 种优势细菌,其编号分别为 B1、B7、B9、B12、B13、B17;6 种优势真菌(主要为霉菌),其编号分别为 F1、F5、F8、F9、F14、F16;6 种优势放线菌,其编号分别为 Z1、Z12、Z15、Z28、Z29、Z31。其中,对照土壤中的优势微生物为 B1、B7、B13、Z1、Z15、Z28、F5、F8、F16;处理 1 土壤中的优势微生物为 B1、B12、Z1、Z15、Z29、F1、F5、F8;处理 2 土壤中的优势微生物为 B1、B13、Z1、Z12、Z29、F1、F5、F8、F9;处理 3 土壤中的优势微生物为 B1、B17、Z1、Z31、F1、F5、F8、F14。

2.3.1 优势细菌的分类鉴定 对细菌进行革兰氏染色和生理生化鉴定,结果表明:优势细菌均为杆菌,B1、B9、B17 为革兰氏阳性菌,其他均为阴性菌。B1 菌落较大、乳白色、呈假根状、表面粗糙,菌体呈

杆状、链杆状,有芽孢,且芽孢位于菌体中间,能液化明胶、发酵葡萄糖产酸,V-P 试验、甲基红试验、吲哚试验、柠檬酸盐试验、接触酶试验、氧化酶试验均为阳性;B7 菌落圆形、边缘整齐、表面光滑、黄绿色微带蓝、无芽孢、有鞭毛,能氧化葡萄糖产酸不产气、能还原硝酸盐、不产生吲哚,接触酶试验、氧化酶试验均为阳性;B9 菌体生长缓慢,菌落呈花菜状、乳白色,细胞呈直杆状,淀粉水解试验、明胶液化试验、硫化氢试验、硝酸盐还原试验均为阴性;B12 菌落较小、乳白色、表面皱褶,菌体呈链状排列、有周鞭毛、无芽孢,氧化酶试验、接触酶试验均为阳性,不产生吲哚、不利用葡萄糖;B13 菌落边缘整齐、中央微隆起、表面光滑有光泽、产黄色素,菌体呈直短杆状、两端略圆,接触酶试验、氧化酶试验均为阳性,明胶液化试验、V-P 试验、甲基红试验均为阴性;B17 菌落小、圆形、边缘整齐、中央凸起,表面光滑、湿润,产黄色素,菌体为短杆状,过氧化氢酶试验、接触酶试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验均为阳性。

根据细菌的菌落形态、个体形态及其生理生化试验结果,得出 B1 菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),B7 菌属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),B9 菌属于分枝杆菌属(*Mycobacterium*),B12 菌属于产碱杆菌属(*Alcaligenes*),B13 菌属于黄杆菌属(*Flavobacterium*),B17 菌属于短杆菌属(*Brevibacterium*)。所有土壤中均含有 *Bacillus*,且含量较高,*Alcaligenes* 和 *Flavobacterium* 在土壤中的比例较低,且对照土壤中其数量为 0,这可能与灵芝种植有密切关系,有待进一步研究。

2.3.2 优势放线菌的分类鉴定 对不同栽培年限土样中的放线菌进行个体形态、培养特征及显微结构观察,结果表明:Z1 菌落表面呈灰色粉末状、干燥多孔、中间凸、边缘呈裂锯齿状,菌丝具树状分支、白色,基内菌丝无色透明,气生菌丝较粗、颜色较暗,孢子丝链状、直或弯曲,孢子呈椭圆形;Z12 菌落表面呈黄色粉末状、边缘小波状,基内菌丝浅黄色,气生菌丝黄白色,孢子丝成螺旋形、直波曲状,孢子呈球形;Z15 菌落圆形、中间凸、褶皱、全缘,基内菌丝蓝色,气生菌丝淡灰色,孢子丝螺旋形或钩形,孢子椭圆形;Z28 菌落为乳白色、小、中间微凸、圆形、边缘整齐,基内菌丝灰白色,气生菌丝白色,孢子丝螺旋形,孢子为椭圆形;Z29 菌落多褶皱、圆形、边缘整齐,基内菌丝无色,气生菌丝淡紫色,培养基上产黑色素,孢子丝为大螺旋形,孢子为球形;Z31 菌落圆形致密、小、皮革样、表面光滑、中间微凸、边缘整齐、呈红色,表面覆盖一薄层孢子,基内菌丝纤细、弯曲,

无气生菌丝,孢子沿菌丝交替线形成葡萄串。

根据形态和显微结构观察,除 Z31 属于小单孢菌属 (*Micromonospora*),其他均属于链霉菌属 (*Streptomyces*)。土壤中优势放线菌数量最多的属是 *Streptomyces*,其次是 *Micromonospora*,其中 *Streptomyces* 种类较多,有灰色类群、黄色类群、蓝色类群、白色类群、淡紫灰类群,在处理 1、2、3 土壤中的含量均比对照降低,其中白孢类群下降较多, *Micromonospora* 和其他类放线菌的变化没有明显规律。

**2.3.3 优势真菌的分类鉴定** 对不同栽培年限土样中的真菌进行个体形态、培养特征及显微结构观察,结果表明:F1 菌落致密、圆形,扩展迅速,整个菌落全部为深绿色粉状物,菌丝较细,分生孢子梗垂直对称,分生孢子簇生、圆形、蓝绿色;F5 菌落近圆形、中间有深绿色的粉状环,外围有一圈白色的菌落带,扩展较慢,分生孢子梗多次分支成扫帚状,孢子圆形、绿色或无色;F8 菌落较大、蜘蛛网状、扩展扁平、黄绿色,菌丝较粗、有隔、有足细胞,顶囊球形,孢子穗、分生孢子蓝绿色、较大、圆形;F9 菌落初为白色棉絮状,生长速度快,很快变为灰色,最后变为黑色,菌丝发达、多分枝、无假根和匍匐丝,孢囊梗直立、单生,顶端着生球状的孢子囊,孢子囊下面无囊托,孢囊孢子椭圆形、无色;F14 菌落开始长出灰白色纤细菌丝,呈棉絮状,最后变成橘红色霉层,霉层蓬松、孢子粉量大,菌丝有隔分支,分生孢子多而丛生,孢子为卵圆形,着生于直立、二分叉的分生孢子梗上,有大、小型分生孢子之分,成串生长;F16 菌落很大、白色棉絮状,菌丝分化出假根和匍匐丝,孢囊梗单生,顶端着生球状的孢子囊,半球形绿色囊轴,有大量孢囊孢子。

根据形态和显微结构描述,F1 属于木霉属 (*Trichoderma*),F5 属于青霉属 (*Penicillium*),F8 属于曲霉属 (*Aspergillus*),F9 属于毛霉属 (*Mucor*),F14 属于链孢霉属 (*Neurospora*),F16 属于根霉属 (*Rhizopus*)。处理 3 土壤中木霉属和青霉属真菌含量明显高于对照,处理 2 木霉属、青霉属、链孢霉属和曲霉属真菌含量均较高,处理 1 土壤中各类菌属均有,含量均比对照高。

#### 2.4 灵芝连作障碍的生物防治效果

由表 4 可知,各因素 A:S、B:S、C:S、D:S 对灵芝产量影响的大小依次为 B:S>D:S>C:S>A:S,其中在土壤中添加枫树木屑发酵原料对灵芝增产率影响最大,而在在土壤中添加紫檀木屑发酵原料对灵芝增产率影响不大。4 种发酵原料的最佳

组合为:A:S 为 1:2,B:S 为 1:1,C:S 为 1:1,D:S 为 1:1,即紫檀木屑:枫树木屑:椰糠椰壳:玉米秸秆:土壤=1:2:2:2:2,此条件下灵芝增产率最高。

表 4 发酵原料配方正交试验结果

试验号	因素				增产率/%
	A:S	B:S	C:S	D:S	
1	1	1	1	1	18.4
2	1	2	2	2	13.1
3	1	3	3	3	8.6
3	2	1	2	3	16.5
5	2	2	3	1	15.1
6	2	3	1	2	10.3
7	3	1	3	2	14.2
8	3	2	1	3	13.5
9	3	3	2	1	12.3
$k_1$	13.4	16.4	14.1	15.3	
$k_2$	14.0	13.9	14.0	12.6	
$k_3$	13.3	10.4	12.7	12.9	
R	0.7	6.0	1.4	2.7	

### 3 结论与讨论

本研究结果表明,随着栽培年限的增加,土壤微生物种群中细菌数量逐渐减少,真菌数量逐渐增加,土壤肥力有下降的趋势。特别是栽培 2 a 后,灵芝种植地土壤微生物总数、细菌总数、放线菌总数和真菌总数均与对照差异极显著,3 种主要微生物类群的比例渐渐趋于失衡,这与袁龙刚等<sup>[17]</sup>、马云华等<sup>[18]</sup>的研究结果基本一致。随着栽培年限的增加,好气性纤维素分解菌和好气性固氮菌数量均呈下降趋势,两大有益生理类群数量的减少破坏了土壤微生物区系的平衡。

灵芝连作后土样中的优势菌群发生了变化。*Bacillus* 在不同栽培年限土壤中都存在,但含量随栽培年限增加而减少,*Flavobacterium* 和 *Alcaligenes* 在土壤中的比例较低,且在对照中其数目为 0;土壤中的优势放线菌为 *Streptomyces*,在连作土壤中的含量均比对照下降,其种类较多,有灰色类群、黄色类群、蓝色类群、白色类群、淡紫灰类群,其中白孢类群在连作土壤中下降较多, *Micromonospora* 和其他类放线菌的变化无明显规律。优势真菌中,栽培 3 a 土壤中的 *Trichoderma* 和 *Penicillium* 含量明显高于对照,栽培 2 a 土壤中 *Trichoderma*、*Penicillium*、*Neurospora* 和 *Aspergillus* 含量均较高,栽培 1 a 土壤中各类菌属均有,且含量均比对照高。值得一提的是,灵芝栽培种植过程中出现的病原真菌在连作土壤中均分离到,且含量均比对

照高。由此可见,连作改变了灵芝栽培土壤中原来的微生物平衡,特别是病原真菌改变了原有的土壤微生物,但具体是哪一种菌有待做进一步的分子鉴定。

#### 参考文献:

- [1] 蒋冬花. 培养基配方与栽培方式对灵芝产量和质量的影响[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2001, 19(1): 76-79.
- [2] 池小妹. 我国灵芝人工栽培技术研究现状[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(8): 791-792.
- [3] 叶向花, 杨勇岐. 灵芝栽培新技术[J]. 现代农业科技, 2007(16): 46.
- [4] 谭雪莲, 郭晓冬, 马明生, 等. 连作对马铃薯土壤微生物区系和产量的影响[J]. 核农学报, 2012, 26(9): 1322-1325.
- [5] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物研究方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [6] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [7] 郑平. 环境微生物学实验指导[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
- [8] 王家岭. 环境微生物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 330-336.
- [10] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [11] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1973.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [13] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [14] 邹莉, 袁晓顾, 李玲, 等. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 27-30.
- [15] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物研究方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [16] 李文建. 肠道需氧优势菌群分离方法的建立及初步应用[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(5): 315-316.
- [17] 袁龙刚, 张军林, 张朝阳, 等. 连作对辣椒根际土壤微生物区系影响的初步研究[J]. 陕西农业科学, 2006(2): 49-50.
- [18] 马云华, 魏珉, 王秀峰. 日光温室连作黄瓜根区微生物区系及酶活性的变化[J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1005-1008.
- [12] 张树堂. 一次性采收上部烟叶的成熟度及成熟特征研究[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(5): 123-129.
- [13] 王怀珠, 汪健, 胡玉录, 等. 茎叶夹角与烤烟成熟度的关系[J]. 烟草科技, 2005(8): 32-34.
- [14] 王怀珠, 汪健, 胡玉录, 等. 茎叶夹角在判断烤烟成熟度中的作用[J]. 湖北农业科学, 2005(4): 79-81.
- [15] 陈宝燕, 马兴旺, 杨涛, 等. 棉花生育时期 SPAD 值准确性与样本数的关系[J]. 中国农业科学, 2011, 44(22): 4748-4755.
- [16] 李刚华, 薛利红, 尤娟, 等. 水稻氮素和叶绿素 SPAD 叶位分布特点及氮素诊断的叶位选择[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1127-1134.
- [17] 贾良良, 陈新平, 张福锁. 叶绿素仪与植株硝酸盐浓度测试对冬小麦氮营养诊断准确性的比较研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 157-160.
- [18] 姜丽芬, 石福臣, 王化田, 等. 叶绿素计 SPAD-502 在林业上应用[J]. 生态学杂志, 2005, 24(12): 1543-1548.
- [19] 周丽丽, 刘爱琴, 唐莉娜, 等. 不同养分配施对‘云烟 87’叶绿素与 SPAD 的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13): 147-154.
- [20] 魏彬, 曾繁东, 林建委, 等. 基于 SPAD 仪的精准施肥模式对烤烟叶片生长发育及产量性状的影响[J]. 广东农业科学, 2012(16): 13-16.
- [21] 许大全. 叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(9): 896-898.
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-137.
- [23] 李佛琳, 赵春江, 王纪华, 等. 不同成熟度烤烟鲜叶的高光谱响应及其判别分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 37(6): 565-569.
- [24] 韩锦峰, 宫长荣, 黄海棠, 等. 烤烟叶片成熟度的研究 I. 烤烟叶片成熟和衰老过程中某些生理生化变化的研究[J]. 中国烟草, 1990(1): 9-13.
- [25] 李佛琳, 赵春江, 刘良云, 等. 烤烟鲜烟叶成熟度的量化[J]. 烟草科技, 2007(1): 54-58.
- [26] 曾建敏, 姚恒, 李天福, 等. 烤烟叶片叶绿素含量的测定及其与 SPAD 值的关系[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 56-62.
- [27] 徐照丽, 李天福. SPAD-502 叶绿素仪在烤烟生产中的应用研究[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(4): 23-24.

(上接第 52 页)