

臭氧水应用于温室土壤消毒的探究

张涵¹ 郑亮^{1,2} 黄卓¹ 宋卫堂^{1,2*}

(1. 中国农业大学 水利与土木工程学院,北京 100083;

2. 农业农村部设施农业工程重点实验室,北京 100083)

摘要 针对传统土壤消毒方法存在污染环境、危害作物的问题,对臭氧水应用于温室土壤消毒的可行性进行研究。以常见土壤消毒剂石灰氮为对照,研究臭氧水质量浓度($\rho(\text{O}_3)$)和灌溉周期对温室土壤(土层厚度0~30 cm)中细菌、真菌、放线菌和线虫消减率的影响。结果表明:1)用臭氧水进行土壤消毒可达深度为15~20 cm的土层,可覆盖常见温室园艺作物的根际范围,预期可减少根际染病;2) $\rho(\text{O}_3)=5$ mg/L的臭氧水3次处理后土壤(0~30 cm)微生物消减率高于 $\rho(\text{O}_3)=20$ mg/L的臭氧水1次处理的土壤;3)用 $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15$ mg/L的臭氧水,间隔7 d浇灌土壤,连续浇灌3次,并覆盖白色PE农用地膜,可达到最为理想的土壤(0~30 cm)微生物消减效果,以此浇灌制度进行土壤消毒对土壤细菌、真菌、放线菌和线虫的消减率分别为44.64%、53.53%、46.12%和48.64%,除线虫消减率略低于石灰氮对照组以外,臭氧水对土壤细菌、真菌、放线菌的消减率均高于对照组;4)原始土壤中硝酸菌属、亚硝酸菌属、芽孢杆菌属和链霉菌属所占比例为5.3%,臭氧水处理后增加到7.4%,使土壤中有益微生物所占的比例略微提升。臭氧水应用于温室土壤消毒可以达到良好的土壤微生物和线虫的消减效果,且与传统的化学消毒剂相比不会产生有害副产物,因此可以将臭氧水用于防控设施内土传病害。

关键词 温室土壤消毒; 臭氧水; 土传病原菌; 灭菌率; 浇灌制度

中图分类号 S626.5;S436.3

文章编号 1007-4333(2021)11-0189-11

文献标志码 A

Study on the application of ozone water in greenhouse soil disinfection

ZHANG Han¹, ZHENG Liang^{1,2}, HUANG Zhuo¹, SONG Weitang^{1,2*}

(1. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Agricultural Engineering in Structure and Environment of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China)

Abstract In view of the problems of environmental pollution and crop damage of traditional soil disinfection methods, the feasibility of using ozone water in greenhouse soil disinfection was studied. The effects of ozone water mass concentration ($\rho(\text{O}_3)$) and irrigation cycle on the removal rates of bacteria, fungi, *Actinomycetes* and nematodes in greenhouse soil (0–30 cm in thickness) were investigated with lime nitrogen as control. The results showed that: 1) Soil disinfection with ozone water reached a depth of 15 to 20 cm, which covered the rhizosphere of common greenhouse horticultural crops and is expected to reduce rhizosphere disease infection; 2) The reduction rate of microorganisms in the soil (0–30 cm) treated with $\rho(\text{O}_3)=5$ mg/L for three times was higher than that in the soil treated with $\rho(\text{O}_3)=20$ mg/L for once; 3) The optimum effect of soil microorganism reduction achieved by irrigating ozone water $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15$ mg/L 3 times with intervals of 7 days, and covering with PE agricultural mulch. The reduction rates of soil bacteria, fungi, actinomycetes and nematodes under this method were 44.6%, 53.5%, 46.1% and 48.6%, respectively. The reduction rates of soil bacteria, fungi and *Actinomycetes* under this irrigation method

收稿日期: 2021-04-02

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-23-C02)

第一作者: 张涵, 硕士研究生, E-mail: zzyangiong@163.com

通讯作者: 宋卫堂, 教授, 主要从事设施园艺栽培技术与设备研究, E-mail: songchali@cau.edu.cn

were all higher than those under the control group except for the nematodes, which was slightly lower than that under the control group; 4) The proportion of nitrobacteria, nitrite, bacillus and streptomycetes in the original soil was 5.3%, which increased to 7.4% after ozone water treatment, and the proportion of beneficial microorganisms in the soil was slightly increased. In conclusion, the application of ozone water in greenhouse soil disinfection can achieve a good subtractive effect of soil microorganisms and nematodes, without producing harmful by-products compared with traditional chemical disinfectants. Therefore, the ozone water can be used to control soil-borne diseases in greenhouses.

Keywords greenhouse soil disinfection; ozone water; soil borne pathogen; the disinfection rate; suitable irrigation method

日光温室是我国北方特有的农业设施形式,因其造价较低且节约能源而得到了大面积的推广应用^[1]。由于日光温室相对封闭,常面临温湿度高、通风性较差等问题^[2],使得病原微生物极易生存和繁殖,且土传病害病原菌的抗逆性高,存活力强^[3]。温室内作物连作生产,土壤中的植株残体及根系分泌物为病原物提供了丰富的营养和寄生载体,导致土壤环境恶化,土传病害严重^[4],对温室土壤进行消毒具有重要意义。

传统土壤消毒方式有物理消毒(如太阳能消毒、蒸汽消毒等)和化学消毒及生物防治等^[5-6]。但太阳能消毒不适宜太阳辐射少的地区,且效果局限于土壤表层^[7]。蒸汽消毒要求土温必须在 70 °C 以上保持 30 min,对消毒温度及时间要求严格,消毒设备成本较高,装配难度大^[8]。利用化学农药进行土壤消毒是目前农户的首要选择,但长期使用农药会引起病原物产生抗药性和耐药性^[9],而且农药超标使用导致的农药残留问题,将影响设施产品的商品性^[10]。生物熏蒸方式利用植物在有机质分解过程中释放出挥发性物质来抑制或杀死土壤中的有害生物^[11],生物熏蒸剂作用的基本原理以及土壤和植物之间的关系仍有待研究^[6]。在有机农业新形势下,作物病害管理应做到“防控为主,治疗为辅”,进而实现园艺产品安全、高品质生产。

臭氧水是臭氧部分溶于水后形成的具有广谱、高效杀菌作用的强氧化剂,常温下可还原为氧气,对环境不会产生污染,无残留毒性。臭氧水杀菌具有破坏微生物遗传物质、细胞膜、及生存所需酶和蛋白质等多种途径,相比杀菌原理单一的农药,可有效减少抗药性的产生^[12-14]。此外,随着经济社会的发展,人们对绿色有机概念的认识逐渐增强。臭氧不但能够降解土壤中的有机农药,还可以降低重金属离子的流动性从而减少重金属离子通过食物链在人体内的积累。将臭氧水用于温室内的土壤浇灌,预期可以达到杀菌消毒,防控病害的效果^[15-16],具有广阔的

应用前景。

目前,关于利用臭氧水防治土传病害的研究多集中于病原菌的离体试验,已证实其对多种植物致病病原菌的杀灭或抑制作用。在盆栽条件下,浇灌臭氧水均可改善西瓜嫁接苗连作土壤的微生物群落结构,降低根结线虫的发病率,在一定程度上缓解西瓜的连作障碍,其中 $\rho(\text{O}_3) = 1.5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水效果最为显著^[17]。当营养液中 $\rho(\text{O}_3) = 4.0 \text{ mg/L}$ 时,对基质中线虫的灭杀率可达到 88.3%^[18]。用不同浓度的臭氧水处理灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、叶霉病菌(*Fulvia fulva*)以及瓜链格孢菌(*Alternaria cucumerina*),结果显示臭氧水处理组菌落及菌丝生长均得到抑制,其中 $\rho(\text{O}_3) = 2.5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水对菌丝的生长抑制作用最佳^[19]。臭氧杀灭营养液中 3 种植物病原菌所需的残余臭氧浓度与接触时间的研究表明, $\rho(\text{O}_3) = 0.6 \text{ mg/L}$,接触时间 5 min 时,臭氧对 10^3 CFU/mL 浓度黄瓜枯萎病、番茄枯萎病和 10^6 CFU/mL 浓度十字花科软腐病的杀灭率均接近 100%^[16]。说明臭氧水在一定程度上可以代替化学农药,用于植物病虫害的防治。

相比传统农药或物理消毒方式,臭氧水浇灌土壤是一种简便易行的替代方式,但尚缺乏系统试验论证。本研究拟针对臭氧水应用于温室土壤消毒的浓度、灌溉周期以及深层土壤的消毒效果进行研究,以为利用臭氧水防控温室土传病害提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2018 年 7 月—10 月,在日光温室的休耕期进行。日光温室位于北京市昌平区(40°13' N, 116°16' E),温室坐北朝南,沿东西走向延长,南北跨度 10.3 m,顶高 4.4 m,东西长 97 m。土壤微生物的观测和计数在现场取样留存,于中国农业大学上庄实验站微生物实验室内进行。

在日光温室内将试验土壤划分为多个 $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ 的区域作为独立试验区, 每次浇灌臭氧水后, 将各试验区独立覆盖地膜, 覆盖采用白色 PE 农用地膜 (0.03 mm), 用以延缓臭氧散失、维持土温, 辅助提升消毒效果。

1.2 试验方法

1.2.1 臭氧水制备与土壤的理化性质

臭氧水制备装置主要由臭氧发生器、氧气瓶、气液混合泵、溶解臭氧浓度检测器和储液桶组成。以氧气为气源, 为贴近生产实际, 制备用水选用静置过夜的自来水。氧气通入臭氧发生器内通过高压放电反应产生臭氧, 臭氧气体利用气液混合泵混入储液桶的自来水中以制备不同浓度的臭氧水, 臭氧水的浓度采用 Q45H/64 溶解臭氧检测仪器 (ANALYICAL TECHNOLOGY, INC., 美国) 检测。臭氧水土壤浇灌在上午 8:00 进行, 将储液桶中加入 10 L 自来水, 用硝酸调节水的 pH 为 4.0, 以提高臭氧水的稳定性^[17], 分别制备所需浓度的臭氧水用于试验区的土壤浇灌试验。

试验前对土壤理化性质进行测定, 原始土壤含水率为 $35\% \sim 40\%$, pH7.04, 硝态氮和铵态氮的质量分数分别为 2.3 和 18.8 mg/kg, 有机质 2.3%。

1.2.2 土壤微生物计数

土壤中细菌、真菌和放线菌等微生物计数采用系列稀释和平板培养计数的方法。用灭菌后的工具取 10 g 土样稀释入 90 mL 无菌蒸馏水, 然后将土壤溶液进行系列稀释^[20-21], 分别涂布于 LB 培养基、PDA 培养基和高氏一号培养基, 用于细菌、真菌和放线菌的培养。测定土壤含水量, 计算每 g 干土中的细菌、真菌、放线菌数量, CFU/g。

土壤中线虫分离及计数: 取 0~30 cm 深度的土壤样品 100 g, 采用食盐悬浮离心法分离线虫, 在体视显微镜 (SZ51, 奥林巴斯, 日本) 下观察计数, 并测定土壤含水率, 计算每 100 g 干土中含有的线虫数目。

$$\text{微生物减退率} = [(N_0 - N)/N_0] \times 100\%$$

式中: N_0 为原始土壤中的微生物数; N 为处理后土样中的微生物数。

1.2.3 试验设计

为系统研究酸性臭氧水在温室土壤消毒中的应用方法, 本研究从臭氧水消毒的土壤覆盖范围、适宜浓度和合理浇灌周期等问题出发, 分别设计了系列现场试验。

1) 臭氧水消毒的土壤深度覆盖范围试验。设置 5 个 $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ 的试验区, 以自来水为对照组 ($\rho(\text{O}_3) = 0\text{ mg/L}$), 分别用 $\rho(\text{O}_3) = 5, 10, 15, 20\text{ mg/L}$ 的臭氧水间隔 3 d 浇灌 1 次, 每次浇灌 10 L, 连续浇灌 3 次。3 次处理结束后 48 h, 取表层 0~5 cm 的土壤和深层 15~20 cm (黄瓜、番茄的主根可达到 20 cm 深的土层) 的土壤, 检测样品中微生物的数量。

2) 温室土壤消毒的适宜臭氧水浓度试验。高浓度的臭氧水制备难度较高且半衰期较短, 因而生产中以低浓度的臭氧水为宜, 为验证低浓度臭氧水重复处理能否替代高浓度臭氧水达到适宜的消毒效果, 设置了 $\rho(\text{O}_3) = 5\text{ mg/L}$ 和 $\rho(\text{O}_3) = 20\text{ mg/L}$ 2 个处理组。 $\rho(\text{O}_3) = 20\text{ mg/L}$ 处理于第 1 天浇灌臭氧水 1 次, 浇灌 10 L, $\rho(\text{O}_3) = 5\text{ mg/L}$ 处理分别于第 1、4、7 天各浇灌 1 次, 浇灌 10 L, 浇灌完成均立刻覆膜。第 9 天, 取 2 个试验组 0~30 cm 的土壤检测微生物数量。

3) 温室土壤消毒的适宜臭氧水浇灌制度的试验。为防止土壤消毒对作物生长的影响, 温室土壤消毒一般在休耕期 (夏季, 1~2 个月) 进行。本试验模拟了在休耕期进行土壤消毒, 并检验休耕期结束后第 30 天和第 60 天土壤中微生物的消减率, 以对比臭氧水处理组与石灰氮对照组的实际使用效果。本试验设置了不同的臭氧水质量浓度及浇灌时间间隔 (3、7、10 d), 用以验证合理处理制度及其对土壤消毒后的中长期效果。

本试验共设置 4 个组: I 组为对照组, 试验第 1 天施入 0.1 kg 石灰氮后浇水 10 L 并覆膜; 其余为处理组, 各组分别取 5 个 $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ 的试验区, 浇灌自来水 ($\rho(\text{O}_3) = 0\text{ mg/L}$) 及 $\rho(\text{O}_3) = 5, 10, 15, 20\text{ mg/L}$ 的臭氧水。浇灌周期如下:

II 组, 试验开始第 1、4、7 天间隔 3 d 浇灌 1 次, 连续浇灌 3 次。

III 组, 试验开始第 1、8、15 天间隔 7 d 浇灌 1 次, 连续浇灌 3 次。

IV 组, 试验开始第 1、11、21 天间隔 10 d 浇灌 1 次, 连续浇灌 3 次。

第 30 天和第 60 天取 I、II、III、IV 组内各区的土壤样品检测微生物数量, 各区设置 3 个重复。

4) 臭氧水消毒对温室土壤微生物群落影响试验。为验证臭氧水是否会降低土壤微生物多样性、改变菌群比例, 进一步验证臭氧水防控土传病

害的可行性设计此试验。设置2个 $1\text{ m}\times 1\text{ m}$ 的试验区,分别为石灰氮对照组和臭氧水处理组。对照组在试验开始第1天施入 0.1 kg 石灰氮后浇 10 L 自来水并覆膜。处理组在试验开始第1、8、15天浇灌 10 L $\rho(\text{O}_3)=10\text{ mg/L}$ 的臭氧水,于第30天采用五点取样法取样。通过对比分析其Alpha多样性指数(Sobs指数、Shannon指数、Coverage指数和ACE指数),比较各处理对土壤微生物群落多样性和丰富度的影响。选择测序结果中含量在1%以上的益生菌进行分析和比较各组硝酸菌属、亚硝酸菌属、芽孢菌属和链霉菌属的比例。

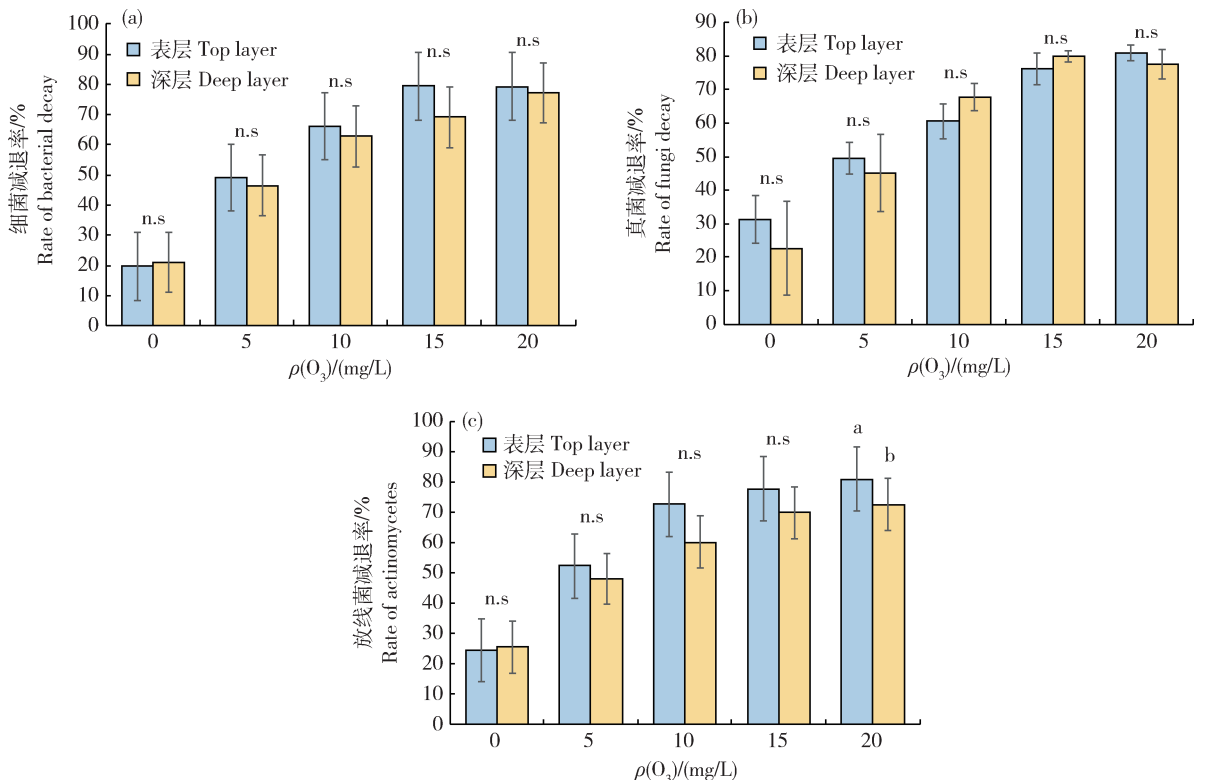
1.3 统计分析

采用Excel 2010软件对试验数据进行整理,用SPSS 20.0进行方差分析,利用Tukey法进行不同处理样本间差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 臭氧水对不同深度土壤微生物的消减效果

土壤表层致病微生物可接触作物的根、茎和叶位较低的叶片,引发作物病害,而土壤深层致病微生物亦可侵染植物根系使其染病。本试验分别取臭氧水处理后的 $0\sim 5\text{ cm}$ 表层土壤和 $15\sim 20\text{ cm}$ 深层土壤进行微生物计数。结果显示臭氧水对表层土壤的细菌类微生物消减效果在数值上略高于深层土壤,但不同质量浓度臭氧水对表层和深层土壤中细菌和真菌类微生物的消减效果差异均不显著;放线菌的试验结果与之类似,除 $\rho(\text{O}_3)=20\text{ mg/L}$ 处理组外,其他处理组表层放线菌消减率和深层土壤放线菌消减率不存在显著差异(图1)。可知,在本试验条件下,臭氧水的土壤微生物消减效果至少可以到达黄瓜、番茄等常见温室作物根系分布的 $15\sim 20\text{ cm}$ 土层。



不同小写字母表示处理间存在显著差异, n. s 表示无显著差异, 图2同。

The different lowercase letters stand for significant difference between treatments. n. s stands for no significant difference. Fig. 2 is the same.

图1 不同质量浓度臭氧水对表层(0~5 cm)和深层(15~20 cm)土壤中细菌(a)、真菌(b)、放线菌(c)的消减效果

Fig. 1 Subtractive effects of ozone water with different mass concentrations on bacteria (a), fungi (b) and Actinomycetes (c) in topsoil (0-5 cm) and deep soil (15-20 cm)

2.2 臭氧水浓度对土壤微生物的消减效果

高质量浓度臭氧水 1 次浇灌和低质量浓度臭氧水 3 次浇灌对土壤微生物消减效果见图 2。用 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 的臭氧水浇灌 1 次,土壤中细菌、真菌和线虫的消减率分别为 20.5%、39.4%、27.0%,用 $\rho(\text{O}_3)=5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水间隔 3 d 浇灌 1 次,连续浇灌 3 次,土壤中细菌、真菌和线虫的消减率分别为 49.1%、51.5% 和 59.5%,效果明显优于高

浓度处理组。 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 的臭氧水浇灌 1 次后,土壤中放线菌数量与原始放线菌数量差异不显著,而用 $\rho(\text{O}_3)=5 \text{ mg/L}$ 臭氧水浇灌 3 次,土壤放线菌消减率为 52.5%,显著高于高浓度处理组。由此可知,在本试验条件下,使用 $\rho(\text{O}_3)=5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水重复浇灌 3 次,可以达到优于单次使用 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 臭氧水对土壤中微生物的杀灭效果。

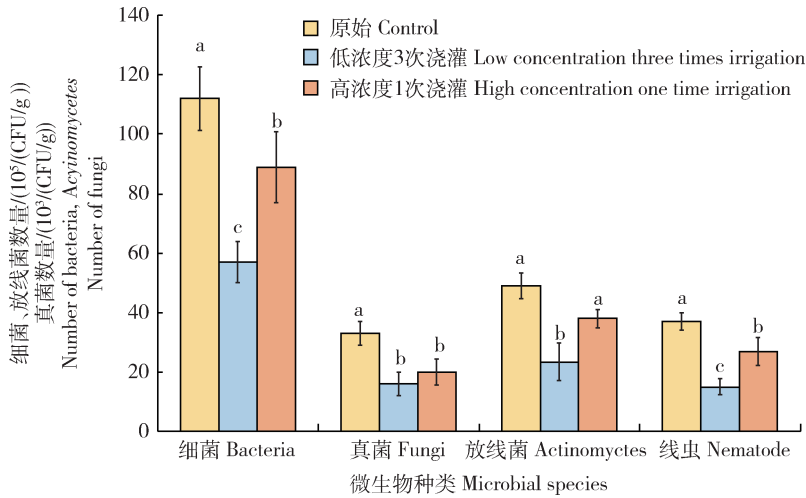


图 2 低浓度 3 次浇灌和高浓度 1 次浇灌土壤中微生物数量

Fig. 2 The number of microorganisms in the soil with 3 treatments at low concentration and 1 treatment at high concentration

2.3 臭氧水适宜浇灌浓度和浇灌间隔

不同质量浓度臭氧水浇灌间隔对土壤中细菌的消减效果见表 1。

浇灌臭氧水第 30 天,对照组细菌减退率为 22.92%。II 组 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 区的减退率最高, $\rho(\text{O}_3)=15 \text{ mg/L}$ 区有所降低但与 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 区的差异不显著, $\rho(\text{O}_3)=5, 10 \text{ mg/L}$ 的 2 个区的减退率降低。III 组 $\rho(\text{O}_3)=15, 20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区差异不显著。IV 组 $\rho(\text{O}_3)=10, 15, 20 \text{ mg/L}$ 的 3 个区的细菌减退率差异不显著。

浇灌臭氧水第 60 天,对照组细菌减退率为 22.61%。II 组内 $\rho(\text{O}_3)=15, 20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区减退率最高, III 组内 $\rho(\text{O}_3)=5, 10 \text{ mg/L}$ 的 2 个区细菌减退率较低, $\rho(\text{O}_3)=15, 20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区的细菌减退率显著提升, IV 组内 $\rho(\text{O}_3)=5, 10 \text{ mg/L}$ 的 2 个区较低, $\rho(\text{O}_3)=15 \text{ mg/L}$ 区的细菌减退率有所提升, $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 区的细菌减退率最高。3 次浇灌完成后,从同一浓度、不同浇灌间隔的结果显示,用 $\rho(\text{O}_3)=5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水间隔 3、7 d 浇灌的

细菌消减率为 49.10%,高于间隔 10 d 的处理组。用 $\rho(\text{O}_3)=10, 15, 20 \text{ mg/L}$ 的臭氧水连续浇灌土壤,间隔 3、7、10 d 的细菌消减率逐渐降低。

可见, $\rho(\text{O}_3)=10 \sim 15 \text{ mg/L}$ 的臭氧水可达到较好的杀灭土壤中细菌的效果,随臭氧水浓度增大,细菌减退率提升不明显。第 60 天, II、III、IV 组内的 $\rho(\text{O}_3)=10 \text{ mg/L}$ 区细菌消减率分别为 36.60%、44.64% 和 43.75%, III、IV 组差异不显著; II、III、IV 组内的 $\rho(\text{O}_3)=15 \text{ mg/L}$ 区细菌消减率分别为 50.89%、56.25% 和 49.10%,差异均不显著。由此可知,在本试验条件下,间隔 7~10 d 浇灌 1 次 $\rho(\text{O}_3)=10 \sim 15 \text{ mg/L}$ 的臭氧水可取得较好的杀灭细菌效果。

不同质量浓度臭氧水浇灌间隔对土壤中真菌的消减效果见表 2。

浇灌臭氧水第 30 天,对照组真菌消减率为 63.63%,除 III 组内 $\rho(\text{O}_3)=15, 20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区外,处理组其余区均低于对照组。除 $\rho(\text{O}_3)=0 \text{ mg/L}$ 区外, II 组内各区真菌消减率差异不显著。III 组内 $\rho(\text{O}_3)=5, 10 \text{ mg/L}$ 的 2 个区灭菌率差异不显著,

表1 不同质量浓度臭氧水浇灌时间间隔对土壤中细菌的消减效果

Table 1 Removal effect of soil bacteria by different concentration of ozone water irrigation intervals

试验组 Experimental group	$\rho(\text{O}_3)/(\text{mg/L})$	细菌减退率/% Rate of bacterial decay	
		第30天 Day 30	第60天 Day 60
I		22.92±1.23	22.61±0.94
	0	22.32±0.36 c	26.78±1.85 c
	5	43.75±1.97 b	41.07±0.14 bc
	10	42.85±1.51 b	36.60±1.25 bc
	15	56.25±2.57 ab	50.89±2.51 ab
II	20	65.17±1.89 a	55.35±1.72 a
	0	25.89±0.85 d	21.13±0.22 c
	5	43.75±2.97 c	38.39±1.30 b
	10	61.60±3.85 b	44.64±0.93 ab
	15	72.14±2.92 a	56.25±3.57 a
III	20	67.85±3.09 ab	57.14±1.57 a
	0	30.35±0.67 c	28.19±1.85 d
	5	42.85±1.36 b	41.96±0.21 c
	10	50.00±1.72 a	43.75±1.21 bc
	15	52.38±1.85 a	49.10±2.89 ab
IV	20	53.27±4.23 a	52.67±3.09 a

注: I 为对照组; II、III、IV 为处理组。不同小写字母表示同处理内的各区间存在显著差异 $P < 0.05$ 。表 2、3、4 同。

Note: Zone I is the lime nitrogen control group. Zones II, III and IV are treatment groups. Different lowercase letters indicate significant differences between intervals within the same treatment group, $P < 0.05$. Table 2, 3, 4 are the same.

$\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区差异不显著。IV 组内 $\rho(\text{O}_3) = 10、15、20 \text{ mg/L}$ 的 3 个区灭菌率不存在显著差异。

浇灌臭氧水第 60 天, 对照组真菌消减率为 52.52%, II 组内各区消减率均低于对照组, III、IV 组内的 $\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区高于对照组。除 $\rho(\text{O}_3) = 0 \text{ mg/L}$ 区外, II、III 组内各区差异不显著, IV 组内 $\rho(\text{O}_3) = 10、15、20 \text{ mg/L}$ 的 3 个区差异不显著。

结果表明, $\rho(\text{O}_3) = 10 \sim 15 \text{ mg/L}$ 是臭氧水杀灭土壤真菌的适宜质量浓度, 臭氧水浓度增加对消减率的提升不明显。第 60 天, II、III、IV 组内的 $\rho(\text{O}_3) = 10 \text{ mg/L}$ 区真菌消减率分别为 42.42%、51.51% 和 53.53%, III、IV 组差异不显著; II、III、IV 组内的 $\rho(\text{O}_3) = 15 \text{ mg/L}$ 区真菌消减率分别为

47.47%、54.54% 和 55.55%, III、IV 组差异不显著。由此可知, 间隔 7~10 d 浇灌 1 次 $\rho(\text{O}_3) = 10 \sim 15 \text{ mg/L}$ 的臭氧水可取得较好的土壤真菌消减效果。

不同质量浓度臭氧水浇灌间隔对土壤中放线菌的消减效果见表 3。

浇灌臭氧水第 30 天, 对照组放线菌消减率为 50.34%, II、III、IV 组内 $\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区的放线菌消减率均高于对照组。II 组内 $\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区消减率差异不显著, III 区内 $\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区消减率差异不显著, IV 组内 $\rho(\text{O}_3) = 10、15 \text{ mg/L}$ 的 2 个区的消减率差异不显著, 消减率显著低于 $\rho(\text{O}_3) = 20 \text{ mg/L}$ 区。

浇灌臭氧水第 60 天, 对照组放线菌消减率为 43.30%, II、III、IV 组内 $\rho(\text{O}_3) = 15、20 \text{ mg/L}$ 的 2 个区的放线菌消减率均高于对照组。II 组内 $\rho(\text{O}_3) =$

表 2 不同质量浓度臭氧水浇灌时间间隔对土壤中真菌的消减效果

Table 2 Removal effect of soil fungi by different concentration of ozone water irrigation intervals

试验组 Experimental group	$\rho(\text{O}_3)/(\text{mg/L})$	真菌减退率/% Rate of fungi decay	
		第 30 天 Day 30	第 60 天 Day 60
I		63.63±5.24	52.52±3.62
	0	24.24±0.24 b	27.17±0.62 b
	5	44.44±1.62 a	34.34±1.62 ab
	10	44.44±0.62 a	42.42±1.01 a
	15	53.53±2.62 a	47.47±0.62 a
II	20	61.61±3.30 a	43.43±2.62 a
	0	34.34±0.62 c	33.33±0.24 b
	5	60.60±1.24 b	47.47±1.62 a
	10	61.61±0.30 b	51.51±3.24 a
	15	72.42±2.04 a	54.54±2.01 a
III	20	73.63±0.73 a	57.57±1.24 a
	0	41.41±1.74 c	38.36±0.24 c
	5	49.49±0.62 bc	46.46±1.30 bc
	10	60.60±3.09 ab	53.53±0.49 ab
	15	57.57±1.24 ab	55.55±1.30 ab
IV	20	61.61±4.30 a	60.60±3.01 a

表 3 不同质量浓度臭氧水浇灌时间间隔对土壤中放线菌的消减效果

Table 3 Removal effect of soil actinomycetes by different concentration of ozone water irrigation intervals

试验组 Experimental group	$\rho(\text{O}_3)/(\text{mg/L})$	放线菌减退率/% Rate of actinomycetes decay	
		第 30 天 Day 30	第 60 天 Day 60
I		50.34±2.38	43.30±0.15
	0	31.97±0.24 c	27.89±1.13 c
	5	43.46±1.84 b	42.24±0.85 b
II	10	49.38±1.34 b	52.24±1.16 ab
	15	60.40±0.69 a	53.06±0.57 ab
	20	66.31±3.95 a	61.40±4.33 a
III	0	32.65±0.35 c	29.48±0.39 c
	5	45.51±2.09 b	39.57±2.35 c
	10	51.22±1.80 b	42.65±1.06 bc
	15	66.32±1.58 a	51.42±1.42 ab
	20	70.40±3.34 a	59.73±0.87 a
IV	0	36.73±0.67 d	31.97±1.11 c
	5	43.46±1.54 c	42.65±1.83 b
	10	47.89±3.09 bc	46.12±2.57 b
	15	51.02±1.94 b	47.55±1.42 b
	20	56.93±3.73 a	54.42±3.34 a

10、15、20 mg/L 的 3 个区放线菌消减率差异不显著,Ⅲ组内 $\rho(\text{O}_3)=15、20$ mg/L 的 2 个区消减率差异不显著,Ⅳ组内 $\rho(\text{O}_3)=5、10、15$ mg/L 的 3 个区放线菌消减率差异不显著,消减率显著低于 $\rho(\text{O}_3)=20$ mg/L 区。

综上所述, $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15$ mg/L 是臭氧水消减土壤放线菌的适宜质量浓度,臭氧水浓度升高对消减率的提升不明显。第 60 天,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组内 $\rho(\text{O}_3)=10$ mg/L 区放线菌消减率分别为 52.24%、42.65% 和 46.12%,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组差异不显著;Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组内 $\rho(\text{O}_3)=15$ mg/L 区放线菌消减率分别为 53.06%、51.42% 和 47.55%,Ⅱ、Ⅲ组差异不显著。由此可知,间隔 3~7 d 浇灌 1 次 $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15$ mg/L 的臭氧水可以取得更好的放线菌消减效果。

不同质量浓度臭氧水浇灌间隔对土壤中线虫的消减效果见表 4。

浇灌臭氧水第 30 天,对照组的线虫消减率为 85.58%,显著高于处理组杀线虫效果。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组均表现为 $\rho(\text{O}_3)=10、15、20$ mg/L 的 3 个区之间的线虫消减率差异不显著。

浇灌臭氧水第 60 天,对照组的线虫消减率为 77.47%,显著高于处理组杀线虫效果。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组均表现为 $\rho(\text{O}_3)=5、10、15、20$ mg/L 的 3 个区之间的差异不显著。

结果表明, $\rho(\text{O}_3)=10$ mg/L 是臭氧水消减土壤线虫的适宜质量浓度,臭氧水浓度升高对线虫消减率提升效果不显著。第 60 天,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组内 $\rho(\text{O}_3)=10$ mg/L 区线虫消减率分别为 56.75%、44.14%、48.64%,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组差异不显著。因此,在此试验条件下,用 $\rho(\text{O}_3)=10$ mg/L 的臭氧水间隔 7~10 d 浇灌 1 次杀线虫效果更好,但由于处理组线虫消减率低于对照组,对于臭氧水能否对有效控制线虫相关的病害仍需进一步研究。

表 4 不同质量浓度臭氧水浇灌时间间隔对土壤中线虫的消减效果

Table 4 Removal effect of soil nematodes by different concentration of ozone water irrigation intervals

试验组 Experimental group	$\rho(\text{O}_3)/(\text{mg/L})$	线虫减退率/% Rate of nematodes decay	
		第 30 天 Day 30	第 60 天 Day 60
I		85.58±2.12	77.47±1.14
	0	47.74±0.24 c	50.45±1.12 a
	5	56.75±1.15 bc	54.95±0.80 a
II	10	63.96±2.62 ab	56.75±1.70 a
	15	62.16±1.68 ab	54.05±2.10 a
	20	68.46±0.12 a	58.55±1.80 a
III	0	29.72±1.40 b	27.02±0.70 b
	5	31.53±0.12 b	37.83±1.10 ab
	10	43.24±2.10 a	44.14±2.80 a
IV	15	47.74±2.12 a	49.54±0.24 a
	20	51.35±0.15 a	45.94±2.15 a
	0	24.32±0.15 c	31.53±0.80 b
IV	5	36.93±1.12 b	43.24±1.15 ab
	10	52.25±0.82 a	48.64±2.68 a
	15	54.05±2.70 a	53.15±1.80 a
	20	57.65±1.62 a	50.54±4.28 a

2.4 臭氧水消毒对温室土壤微生物群落的影响

多样性指数分析结果显示样本 Coverage 指数均在 99% 以上(表 5), 表明测序结果能够很好的代表样本真实情况。表中数据为 Species 物种分类水平上的观测数据, 可知, 原始土壤、对照组土壤、处理

组土壤测到细菌物种分别为 812、814、815 个。Sobs 指数反应丰富度的实际观测值, Shannon 指数反映群落多样性, ACE 指数用于估计样本的群落丰富度, 可见原始土壤、对照组土壤和处理组土壤的群落多样性和群落丰富度差异不大。

表 5 Alpha 多样性指数
Table 5 Alpha diversity index

组别 Group	Sobs	Shannon	ACE	Coverage/%
原始 Original	812	5.524 8	863.533 2	99.70
对照 Control	814	5.625 8	841.085 1	99.84
处理 Treatment	815	5.4951	864.261 1	99.70

土壤微生物中含有许多对农业生产有益的菌, 在原始土壤、对照组土壤和处理组土壤样品的试验结果显示(图 3), 原始土壤、对照组土壤和处理组土壤细菌中分别含有硝酸细菌属 1.2%、1.6%、2.1%; 亚硝

酸细菌属 1.2%、1.7%、1.6%; 芽孢杆菌属 1.1%、2.2%、2.1%; 链霉菌属 1.7%、2.2%、1.6%。原始土壤、对照组土壤和处理组土壤中含量在 1% 以上的益生菌总量的占比分别为 5.2%、7.7% 和 7.4%。

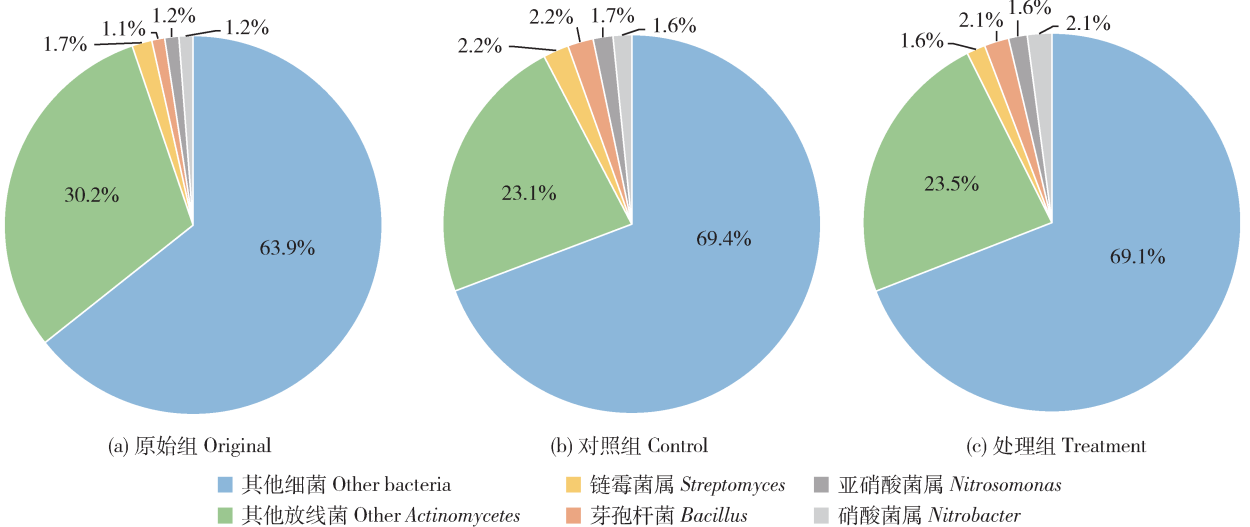


图 3 原始组、对照组和处理组土壤中不同菌群所占比例

Fig. 3 The proportion of different flora in original, control and treatment groups

3 讨论与结论

传统的土壤物理消毒方法消毒效果往往只停留在土壤表层^[22]。本研究检验了臭氧水对于土壤消毒的作用效果对土壤微生物的消减效果至少可达

15~20 cm 的土层, 可以覆盖番茄黄瓜等常见蔬菜作物的根际土壤, 是一种有效的土壤消毒措施。

臭氧难溶于水且极不稳定^[10], 出于对臭氧水使用安全和臭氧水制备难度方面的考虑, 研究中设计了较低浓度臭氧水重复灌溉的试验。在此土壤条件

下,本研究得到采用 $\rho(\text{O}_3)=5 \text{ mg/L}$ 的臭氧水 3 次浇灌的杀菌效果显著高于 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 的臭氧水浇灌 1 次效果的结果。与已有研究结论相似,即采用低浓臭氧水进行多次浇灌处理,浇灌次数的增加可以促进根结线虫的防治效果和作物的生长,实现更好的土传病害防治效果^[23-24]。由此可知,在生产中可采用低浓度臭氧水重复浇灌的方法,既可以降低作业难度,减少对工作人员和植物的伤害,又可以实现更好地土壤消毒效果。

在此土壤条件下,本研究结果显示 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 的高浓度臭氧水浇灌消减效果是最好的,除了间隔 3 d 浇灌第 60 天真菌减退率和间隔 7 d 浇灌第 60 天线虫减退率略低,其余均高于其他浓度处理。但臭氧水浓度过高可能破坏植物的根系,植物根系组织的修复能力难以抵抗高浓度臭氧水的胁迫伤害,从而出现高浓度臭氧水处理的植物生长量低于较低浓度臭氧水处理的现象^[23]。除间隔 10 d 浇灌第 30 天和第 60 天对放线菌消减效果 $\rho(\text{O}_3)=20 \text{ mg/L}$ 区显著高于 $\rho(\text{O}_3)=15 \text{ mg/L}$ 区,其他并未出现显著性差异。同时,制备高浓度臭氧水所耗电成本相对较高。综合考虑,选用 $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15 \text{ mg/L}$ 的臭氧水浇灌最适宜。而不同种类的微生物对浇灌时间间隔的反应不同,间隔 7~10 d 浇灌,可达到更好的消减细菌、真菌和线虫效果,间隔 3~7 d 浇灌可达到更好的放线菌消减效果。消减不同种类微生物的适宜浇灌间隔不同,与不同微生物的繁殖速度和生长曲线相关。综上,用 $\rho(\text{O}_3)=10\sim 15 \text{ mg/L}$ 的臭氧水间隔 7 d 浇灌 1 次,消毒效果较好,利用该制度进行臭氧水浇灌用于土壤消毒后 60 d 内,仍可保持较好的杀菌消毒效果。

从石灰氮和臭氧水对土壤细菌的杀灭情况看,对照组对土壤细菌的杀灭率比处理组的杀灭率低,分析认为这与浇灌臭氧水的 pH 有关。这可能是由于土壤中的细菌、真菌等微生物对 pH4.0 弱酸性水的耐受性比更低,因此用弱酸性的臭氧水浇灌土壤可以从微生物对弱酸环境耐受性低和臭氧的氧化杀菌两个方面来保证土壤消毒效果^[25]。此外,在原始土壤和臭氧水处理组土壤样品的测序结果中,本研究选择含量在 1% 以上的益生菌进行分析和比较。结果显示,原始土壤细菌含量总和为 5.2%;处理组土壤细菌含量总和为 7.4%。臭氧水处理提升了土壤中硝酸菌属和亚硝酸菌属 2 种硝化细菌的比例促进土壤消化作用,使土壤中芽孢杆菌比例增加提高

作物的抗性。

因此,在本试验的条件下,采用臭氧水灌溉温室土壤,用于防治土传病害有可行性。后续研究及应用仍需注意几方面问题:首先,应进行必要的具体的病害感染现场试验,以进一步验证臭氧水实际防治病害的效果;其次,臭氧水可以迅速杀灭病原微生物,但不具选择性,在应用中可能会造成有益微生物的减少,可适当的使用有益微生物菌剂或使用健康的有机肥,来提升土壤中有益菌数量。另外,臭氧水制备中产生的逸散臭氧可能会对环境产生污染,在后续实际应用中,可以在臭氧水制备设备的出气口安装含有催化剂的过滤网,将逸散臭氧迅速转化为氧气,从而减少臭氧逸散对人员和环境的伤害。

参考文献 References

- [1] Cao K, Xu H J, Zhang R, Xu D W, Yan L L, Sun Y C, Xia L R, Zhao J T, Zou Z R, Bao E C. Renewable and sustainable strategies for improving the thermal environment of Chinese solar greenhouses[J]. *Energy and Buildings*, 2019
- [2] 喻景权, 周杰. “十二五”我国设施蔬菜生产和科技进展及其展望[J]. 中国蔬菜, 2016(9): 18-30
Yu J Q, Zhou J. Progress in protected vegetable production and research during China's 12th five-year plan[J]. *China Vegetables*, 2016(9): 18-30 (in Chinese)
- [3] Hausbeck M K. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease*, 1996, 80(11): 1212-1219
- [4] 李萍萍. 设施园艺中的土壤生态问题分析及清洁生产对策[J]. 农业工程学报, 2011, 27(S2): 346-351
Li P P. Soil ecological problem and its resolvent in greenhouse horticulture [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27 (S2): 346-351 (in Chinese)
- [5] Panth M, Hassler S C, Baysal-Gurel F. Methods for management of soilborne diseases in crop production [J]. *Agriculture*, 2020, 10(1): 16
- [6] 张浩然, 杨宁, 温丹, 王晓, 杨延杰, 孙凯宁, 陈宁. 土壤消毒技术在设施蔬菜生产中的研究进展[J]. 山东农业科学, 2020, 52(5): 149-156
Zhang H R, Yang N, Wen D, Wang X, Yang Y J, Sun K N, Chen N. Research progress of application of soil disinfection technology in production of protected vegetables[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2020, 52(5): 149-156 (in Chinese)
- [7] Lombardo S, Longo A M G, Lo Monaco A, Mauromicale G. The effect of soil solarization and fumigation on pests and yields in greenhouse tomatoes[J]. *Crop Protection*, 2012, 37: 59-64
- [8] 李建设, 高艳明. 日本设施环保土壤消毒技术[J]. 西北园艺,

- 2003(11): 52-53
Li J S, Gao Y M. Environmental protection soil disinfection technology in Japanese facilities[J]. *Northwest Horticulture*, 2003(11): 52-53 (in Chinese)
- [9] Michel V V, Ançay A, Fleury Y, Camps C. Green manures to control soilborne diseases in greenhouse production [J]. *Acta Horticulturae*, 2014(1041): 187-196
- [10] 李毅, 李英梅, 张淑莲, 洪波, 张锋, 陈志杰. 臭氧对设施蔬菜病虫害的应用效果[J]. 农业工程, 2012, 2(S1): 31-34
Li Y, Li Y M, Zhang S L, Hong B, Zhang F, Chen Z J. Application effect of O₃ on control disease & pest for greenhouse vegetables [J]. *Agricultural Engineering*, 2012, 2(S1): 31-34 (in Chinese)
- [11] Galletti S, Fornasier F, Cianchetta S, Lazzeri L. Soil incorporation of Brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 75: 73-78
- [12] 邓曼适. 臭氧消毒技术原理及其应用前景分析[J]. 华南建设学院西院学报, 2000(3): 54-58
Deng M S. Principle of ozone disinfecting technology and its application prospect [J]. *Journal of South China Construction University: West Campus*, 2000(3): 54-58, 68 (in Chinese)
- [13] Roy D, Englebrecht R S, Chian E S K. Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone [J]. *Journal-American Water Works Association*, 1982, 74(12): 660-664
- [14] Mudd J B, Leavitt R, Ongun A, McManus T T. Reaction of ozone with amino acids and proteins [J]. *Atmospheric Environment*, 1969, 3(6): 669-681
- [15] Hirayama Y, Asano S, Watanabe K, Sakamoto Y, Ozaki M, Okayama K, Ohki S T, Toji M. Control of *Colletotrichum fructicola* on strawberry with a foliar spray of neutral electrolyzed water through an overhead irrigation system [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2016, 82(4): 186-189
- [16] 宋卫堂, 孙广明, 刘芬, 周立刚, 王凤丽. 臭氧杀灭循环营养液中三种土传病原菌的试验 [J]. 农业工程学报, 2007(6): 189-193
Song W T, Sun G M, Liu F, Zhou L G, Wang F L. Ozone disinfection of three soilborne pathogens in nutrient solution [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007(6): 189-193 (in Chinese)
- [17] 杨敏, 李慧, 易晓华, 李敏. 臭氧水对连作西瓜生长及根结线虫病害的影响 [J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2020, 37(3): 201-205, 229
Yang M, Li H, Yi X H, Li M. Effects of ozone water on watermelon growth and nematode disease in continuous cropping soil [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University: Natural Science*, 2020, 37(3): 201-205, 229 (in Chinese)
- [18] Zheng L, Yang Q, Song W T. Ozonated nutrient solution treatment as an alternative method for the control of root-knot Nematodes in soilless cultivation [J]. *Ozone: Science & Engineering*, 2020, 42(4): 371-376
- [19] 张黎, 孙周平, 余朝阁. 不同质量浓度臭氧水对 *Botrytis cinerea*、*Fulvia fulva* 及 *Alternaria cucumerina* 生长的影响 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(8): 101-104
Zhang L, Sun Z P, Yu C G. Effect of different concentrations of ozonated water on growth of *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva* and *Alternaria cucumerina* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2010, 19(8): 101-104 (in Chinese)
- [20] 曹勘程, 郭美霞, 王秋霞, 李园, 颜冬冬. 世界土壤消毒技术进展 [J]. 中国蔬菜, 2010(21): 17-22
Cao A C, Guo M X, Wang Q X, Li Y, Yan D D. Progress in soil disinfection technology in the world [J]. *China Vegetables*, 2010(21): 17-22 (in Chinese)
- [21] 周茂繁. 植物病原真菌属分类图索 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1989
Zhou M F. *Phytopathogenic Fungi Genus Tusso* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1989 (in Chinese)
- [22] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 2-99
Shen P, Fan X R, Li G W. *Microbiological Experiment* [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2005: 2-99 (in Chinese)
- [23] 何华名, 栗亚飞, 耿鑫辉, 安星辰, 宋卫堂. 不同制备方式臭氧水溶解规律及喷雾特性研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2013, 44(5): 678-682
He H M, Li Y F, Geng X H, An X C, Song W T. On different ozone water generation systems and its spray characteristics [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2013, 44(5): 678-682 (in Chinese)
- [24] 余礼根, 刘楠, 赵倩, 卫如雪, 郭文忠. 不同臭氧浓度处理对盆栽茄子生长发育的影响 [J]. 北方园艺, 2017(19): 1-5
Yu L G, Liu N, Zhao Q, Wei R X, Guo W Z. Effect of different ozone concentrations on growth and development of eggplants [J]. *Northern Horticulture*, 2017(19): 1-5 (in Chinese)
- [25] 张昌爱. 大棚土壤模拟酸化对蔬菜根系生态环境的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2003
Zhang C A. Effects of soil simulation acidation on vegetable root surroundings in greenhouse [D]. Taian: Agricultural University, 2003 (in Chinese)