

防治辣椒疫病的生防放线菌固体发酵培养基优选试验

杨希娟, 蔡晓剑, 陈占全

(青海农林科学院 土壤肥料研究所 青海 西宁 810016)

摘要: 采用固体发酵的方式研究了 2 株防治辣椒疫病生防放线菌固体发酵培养基的种类和配方。结果表明: 采用固态发酵工艺培养 2 株生防放线菌可获得活孢子数高的生防菌剂。玉米粉是适于 A3 和 A5 的 2 株放线菌固态发酵优良 C、N 源物质, 玉米粉 V 培养基可作为 2 株生防放线菌共同发酵的固态培养基质。

关键词: 辣椒疫病; 生防放线菌; 固体发酵

中图分类号: S 436.418.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0179-04

辣椒是我国的特种农产品, 在我国种植范围广、面积大。目前青海省温室辣椒种植面积约 1 000 hm², 年产值高达 1.5 亿元。辣椒已成为青海省辣椒主产区广大农民脱贫致富的特色经济作物^[1]。辣椒在种植过程中常受各种病虫害危害, 严重影响其产量和品质。由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leonian)引起的辣椒疫病是辣椒的一种土传毁灭性病害, 常造成辣椒减产甚至绝收, 严重阻碍了辣椒生产的发展^[2]。辣椒疫病防治已成了限制辣椒产业发展的主要因素之一。当前国内外在辣椒抗病育种、化学防治和农业防治措施等方面做了大量工作, 但防效不佳, 因此探索新的防治途径是控制辣椒疫病的重大课题^[3]。生物防治能从根本上控制辣椒疫病发生, 且不会引起环境污染, 具有很大的发展潜力, 而高效拮抗菌的获得是生物防治的基础。放线菌是一类具有很好开发前景的生防微生物, 但在生产中应用其生防活菌剂普遍存在菌剂不易保存、生防菌活性不稳定等问题。而通过固体发酵生产的菌剂能使生防放线菌的孢子数量大, 活性强, 便于保藏和运输, 并且固体发酵设备简单, 成本低廉, 易于在生产中应用推广^[4]。

通过固体发酵对不同培养基种类和配比的筛选, 找到适合不同生防放线菌生长和产孢的培养基, 生产便于保藏和运输的固体菌剂, 为辣椒疫霉菌生防放线菌的应用提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 生防放线菌是以辣椒疫霉为靶标菌,

根据平皿体外试验和盆栽试验从分离自青海高原土壤的 4 500 余菌株中筛选得到。编号分别为 A3、A5。经初步鉴定, 均为链霉菌属。辣椒疫霉 P3(*Phytophthora capsici* P3)分离自青海省乐都县日光温室, 经纯化培养后镜检以及反接验证确认。

1.1.2 培养基^[4] 斜面培养基、高氏 1 号琼脂培养基。

1.1.3 生防菌剂发酵原料 大米粉, 玉米粉, 黄豆粉, 小米粉, 麸皮均购于西宁市场。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种准备 取用石蜡油保存的生防放线菌 A3、A5 的斜面, 在高氏 1 号琼脂斜面中活化 3 次, 备用。

1.2.2 孢子悬浮液的制备^[5] 活化的菌种接种于高氏 1 号琼脂斜面上, 28℃培养 3 d 后, 吸取 2 mL 的无菌水加入试管中并刮洗斜面, 然后将刮洗液倒入装有 30 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 振荡 5 min 后备用。

1.2.3 固态添加基质中组分比例的确定 将细土与沙子分别配成 45:5、40:10、35:15、30:20、25:25 混合基质, 添加 30% 高氏 1 号液体培养基, 充分混匀, 120℃湿热灭菌 30 min, 接入放线菌液体种子, 每组重复 3 次, 接种量为 5%, 28℃培养 7 d, 观察其生长状况, 然后在加有青霉素的高氏 1 号琼脂培养基上用稀释平板计数法测活菌数。

1.2.4 2 株生防放线菌固体发酵培养基筛选 用大米粉、玉米粉、黄豆粉、小米粉、麸皮等 5 种原料作为有机基质, 按表 1 的干料配比, 加入 30% 液体培养基(接种 A3 菌的固体培养基加入高氏 1 号液体培养基, 接种 A5 菌的液体培养基加入小米液体培养基), 搅拌均匀, 装入塑料广口瓶, 每瓶装入 50 g 培养料, 121℃湿热灭菌 30 min, 冷却, 按相同接种量每瓶接入 5 mL 菌液, 拌匀, 28℃培养, 48 h 后观察结果, 5 d 后取出目测并记录生长情况, 在加有青霉素的高氏 1 号琼脂培养基上用稀释平板涂布法测发酵产物活菌数。

第一作者简介: 杨希娟(1980—), 女, 硕士, 助理研究员, 现从事农业微生物资源方面研究工作。E-mail: 156044169@qq.com。

基金项目: 农业科技成果转化资金资助项目(2008G20110308)。

收稿日期: 2009-09-20

表 1 生防菌固态发酵培养基组成

编号	培养基组成				
	大米粉 : 沙土	玉米粉 : 沙土	黄豆粉 : 沙土	小米粉 : 沙土	麸皮 : 沙土
I	5 : 45	5 : 45	5 : 45	5 : 45	5 : 45
II	10 : 40	10 : 40	10 : 40	10 : 40	10 : 40
III	15 : 35	15 : 35	15 : 35	15 : 35	15 : 35
IV	20 : 30	20 : 30	20 : 30	20 : 30	20 : 30
V	25 : 25	25 : 25	25 : 25	25 : 25	25 : 25
VI	50 : 0	50 : 0	50 : 0	50 : 0	50 : 0
CK	纯土	纯土	纯土	纯土	纯土

2 结果与分析

2.1 固态添加基质中细土与沙子比例的确定

放线菌培养基中一般需添加淀粉类基质, 这类基质颗粒一般较细, 灭菌后容易结块, 所以添加这类基质时需添加固态分散剂, 同时保持水分^[9]。该研究采用细土与沙子的混合物作为培养基中的固态分散基质。二者的不同比例对微生物生长的影响如表 2 与图 3 所示。

由表 2 和图 1 可知, 随着细土比例的减少和与沙子比例的增加, 供试放线菌 A3、A5 的长势和活菌数都呈现先增后降的趋势。当细土与沙子比例为 40 : 10 时, 供试放线菌 A3 生长速度最快, 长势最好, 活菌数最多; 细土与沙子比例为 35 : 15 时, 供试放线菌 A5 生长速度最快, 长势最好, 活菌数最多。因此确定供试放线菌 A3 发酵培养基中固态混合基质中细土与沙子的比例选用 40 : 10 的比例; 供试放线菌 A5 发酵培养基中固态混合基质中细土与沙子的比例选用 35 : 15 的比例。

表 2 细土与沙子不同组合下放线菌的生长状况

菌种	细土 : 沙子	培养时间/ h					
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
A3	45 : 5	—	—	+	++	++	++
	40 : 10	—	+	++	+++	+++	+++
	35 : 15	—	+	++	++	+++	+++
	30 : 20	—	—	+	+	++	++
	25 : 25	—	—	+	+	++	++
A5	45 : 5	—	+	++	+++	+++	+++
	40 : 10	—	+	++	+++	+++	+++
	35 : 15	—	+	+++	++++	++++	++++
	30 : 20	—	+	++	+++	+++	+++
	25 : 25	—	+	++	+++	+++	+++

注: “++++”、“+++”、“++”、“+”、“—”分别表示从外观观察菌种生长“良好”、“较好”、“弱”、“略有生长”和“不生长”。

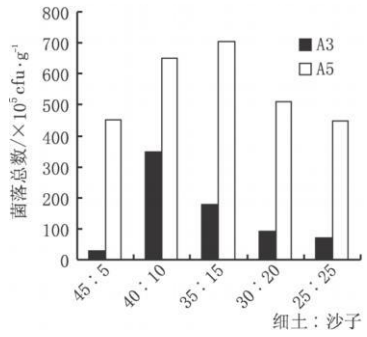


图 1 细土与沙子不同组合下放线菌的活菌数

表 3 2 株生防放线菌在不同组成培养基上的外观生长状况

组分	编号	供试放线菌							
		A3				A5			
		48 h	72 h	96 h	120 h	48 h	72 h	96 h	120 h
大米粉	I	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
	II	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
	III	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+++
	IV	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++
	V	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+++
	VI	++	++	+++	+++	—	+	++	++
玉米粉	I	+	+	++	++	++	++	+++	+++
	II	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
	III	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
	IV	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
	V	++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
	VI	+	++	+++	+++	—	+	++	+++
黄豆粉	I	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	—	—	—	—	—	—	—	—
	III	—	—	—	—	—	—	—	—
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—
	V	—	—	—	—	—	—	—	—
	VI	—	—	+	+	—	—	—	—
小米粉	I	++	++	+++	+++	+	++	++	+++
	II	++	++	+++	+++	+	++	++	+++
	III	+	+	++	++	+	++	++	+++
	IV	+	+	+	+	++	++	+++	+++
	V	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
	VI	+	++	++	+++	—	+	++	++
麸皮	I	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
	II	+	+	+	+	+	++	+++	+++
	III	+	+	+	+	—	+	+	++
	IV	++	++	+++	+++	—	+	++	++
	V	+	+	++	++	—	+	+	++
	VI	—	+	+	++	—	—	+	+
CK		—	+	+	++	—	+	++	++

注: “++++”、“+++”、“++”、“+”、“—”分别表示从外观观察菌种生长“良好”、“较好”、“弱”、“略有生长”和“不生长”。

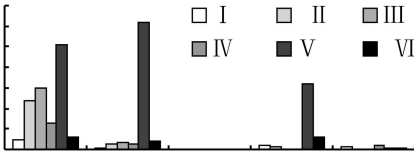


图 2 放线菌 A3 的活菌数

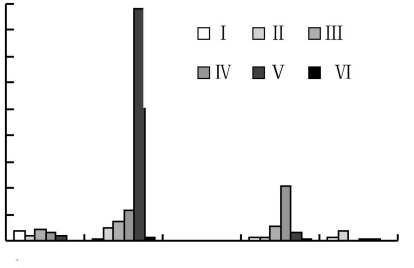


图 3 放线菌 A5 的活菌数

表4 2株生防放线菌在不同培养基上测数结果及方差分析 (×10⁶ cfu/g) (LSD)

组分	序号	编号	供试放线菌							
			A3	序号	差异显著性		A5	序号	差异显著性	
					5%	1%			5%	1%
大米粉	1	I	450	11	a	A	368	11	a	A
	2	II	2345	5	a	A	164	22	b	B
	3	III	2990	23	b	B	454	10	c	C
	4	IV	1265	3	b	B	279	9	cd	CD
	5	V	5120	2	b	BC	180	21	de	CDE
	6	VI	645	4	c	C	29	8	def	DEF
		平均	2 135. 83 ^{aA}				245. 17 ^{cC}			
玉米粉	7	I	41	6	c	C	72	3	defg	DEF
	8	II	298	24	c	C	464	1	defgh	DEF
	9	III	340. 5	12	c	C	750	26	defgh	DEF
	10	IV	289. 5	9	c	C	1130	23	efgh	DEF
	11	V	6180	8	c	C	8800	4	efgh	DEF
	12	VI	435. 5	10	c	C	139	5	efgh	EF
		平均	1 264. 08 ^{bB}				1 892. 5 ^{aA}			
黄豆粉	13	I	0. 11	1	c	C	3. 2	2	efgh	EF
	14	II	2. 41	19	c	C	0. 5	12	fgh	EF
	15	III	0. 05	18	c	C	0. 22	25	fgh	EF
	16	IV	0	25	c	C	0. 2	20	fgh	EF
	17	V	0	20	c	C	0. 22	7	fgh	EF
	18	VI	0	30	c	C	0	31	fgh	EF
		平均	0. 86 ^{dD}				4. 35 ^{dD}			
小米粉	19	I	176. 5	29	c	C	110	29	fgh	EF
	20	II	124. 5	7	c	C	103	19	fgh	EF
	21	III	13	31	c	C	570	28	fgh	EF
	22	IV	2. 76	26	c	C	2080	24	gh	EF
	23	V	3 190	21	c	C	310	6	h	F
	24	VI	583	27	c	C	43	27	h	F
		平均	681. 6216 ^{BC}				536 ^{bB}			
麸皮	25	I	138	22	c	C	130	13	h	F
	26	II	20	14	c	C	370	30	h	F
	27	III	1	13	c	C	3	14	h	F
	28	IV	174	15	c	C	55	17	h	F
	29	V	47	16	c	C	60	15	h	F
	30	VI	64. 6	17	c	C	2. 4	16	h	F
		平均	74. 1 ^{dCD}				103. 4 ^{dCD}			
	31	CK	34. 8 ^{dD}	18	c	C	70. 3 ^{dCD}	18	h	F

注: 表中数据为 3 次重复的平均值; 表中同列数据后的不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$), 不同大写字母表示极显著差异 ($P<0.01$)。

2.2 生防放线菌固态发酵培养基筛选

在菌剂大规模生产中, 要求菌剂发酵时间短, 活菌数大, 这就要求在发酵培养中选用优良的培养基。通过固体发酵对不同培养基种类和配比的筛选, 找到适合不同生防放线菌生长和产孢的培养基, 使固态发酵的菌剂便于保藏和运输, 成本低廉, 易于推广应用。

由表 3 可知, 供试放线菌 A3 在大米粉培养基 II、III、IV、V, 玉米粉培养基 III、IV、V, 小米粉培养基 V 中均生长良好, 生长速度快; 在大米粉, 玉米粉 II、VI 小米粉、II、VI 麸皮 IV 中生长较好; 在玉米粉 I, 小米粉 III 麸皮 V、VI 中生长弱; 在小米粉 IV, 麸皮 II、II 中略有生长, 并且麸皮容易污染杂菌。供试放线菌 A5 在大米粉培养基、III、IV、玉米粉培养基 II、III、IV、V, 小米粉培养基 V 中均生长良好, 生长速度快; 在大米粉 II、V, 玉米粉、VI 小米粉、

II、III、V, 麸皮 I、II 中生长较好; 在大米粉 V, 小米粉 VI 麸皮 III、IV、V 中生长弱; 在麸皮 VI 中略有生长且污染严重。供试放线菌 A3、A5 均不能在黄豆粉不同配比的培养基中生长。

由表 4 可知, 2 株供试放线菌在 5 种发酵基质上的活菌数不同。从各基质不同配比的平均值可以看出, 供试放线菌 A3 在 5 种基质上的活菌数量的排序为: 大米粉> 玉米粉> 小米粉> 麸皮> 黄豆粉, 即大米粉基质上活菌数最多, 黄豆粉基质上最少, 对不同基质培养基上生长的活菌数取平均值, 进行方差分析, 可知大米粉和玉米粉基质都能极显著的促进供试放线菌 A3 的生长, 小米粉可以显著促进其生长; 供试放线菌 A5 在 5 种基质上的活菌数量的排序为: 玉米粉> 小米粉> 大米粉> 麸皮> 黄豆粉, 即玉米粉基质上活菌数最多, 黄豆粉基

质上最少,对不同基质培养基上生长的活菌数取平均值,进行方差分析,可知玉米粉和小米粉基质都能极显著的促进供试放线菌 A5 的生长,大米粉可以显著的促进其生长。同时发现在麸皮基质中 2 株菌虽有菌体生长和产孢,但麸皮基质易染菌,且随着麸皮用量增加,污染程度提高。

由表 4 和图 2、3 可知,供试菌株在不同基质配比中生长的活菌数不同。供试菌株 A3 在玉米粉 V 中活菌数最多,为 $6\ 180(\times 10^6 \text{ cfu/g})$,其次在大米粉 V 和小米粉 V 中生长数量较多,分别为 $5\ 120(\times 10^6 \text{ cfu/g})$ 和 $3\ 190(\times 10^6 \text{ cfu/g})$,并且差异均达到极显著水平;供试菌株 A5 在玉米粉 V 中活菌数最多,为 $8\ 800(\times 10^6 \text{ cfu/g})$,其次为小米粉 IV,活菌数达到 $2\ 080(\times 10^6 \text{ cfu/g})$,并且差异均达到极显著水平。2 株供试放线菌的计数结果与外观生长情况基本一致。

综合以上结果可知,供试放线菌 A3—在大米粉基质上菌体生长速度快,产孢多;在玉米粉基质上菌体生长速度较快,且大量产孢。供试放线菌 A5 在玉米基质上菌体生长速度快,产孢多;在小米粉基质上菌体生长速度较快,且大量产孢。麸皮基质易污染杂菌,黄豆粉培养基不利于供试放线菌的生长,其都不适于作为这 2 株供试放线菌固态发酵培养基的有机原料。考虑到成本和原料的易得性,大米粉的价格是玉米粉的 2 倍多,且大米多作为食品,而玉米多作为饲料使用,因此可选玉米粉作为供试放线菌 A3、A5 共同生产的有机基质,玉米粉 V 培养基作为其共同发酵的固态培养基质。

3 结论

自从 1918 年发现辣椒疫病为止,人们采取了许多防治措施,但是都不能从根本上防治该病。我国自从 1995 年朱宗源研制了生物制剂以来,目前国内外关于辣椒疫病的生防菌制剂的研究还很少,阻碍了生物制剂的普及^[6]。因此选择价格低廉的农副产品为发酵原料,研究生物制剂的制备,可以推动辣椒疫病生物防治的推广与应用。

采用固态发酵工艺培养 2 株生防放线菌可获得活菌数高的生防菌剂。固态添加基质中比较 2 株供试放线菌在不同沙土比例的培养基上生长和产孢。确定供试放线菌 A3 发酵培养基中固态混合基质中细土与沙子的比例选用 40 : 10 的比例;供试放线菌 A5 发酵培养基中固态混合基质中细土与沙子的比例选用 35 : 15 的比例。通过对生防放线菌固态发酵培养基筛选,确定玉米粉是适于 A3、A5 的 2 株放线菌固态发酵优良 C、N 源物质,玉米粉 V 培养基作为其共同发酵的固态培养基质。

参考文献

- [1] 薛泉宏,蔡艳,司美茹,等.一种辣椒疫病生防制剂及其生产方法[P].中国发明专利 CN1543801A,2004-11-10.
- [2] 杨君丽.环境菌量对辣椒疫病发病速率的影响[J].青海农林科技,2004(4):46-47.
- [3] 司美茹,薛泉宏,余博,等.辣椒疫霉拮抗菌的双重筛选[J].植物保护学报,2006,33(1):41-46.
- [4] 程丽娟,薛泉宏,来航线,等.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版社,1988.
- [5] 涂璇.辣椒疫霉生防菌筛选及生防菌应用研究[D].杨凌:西北农林科技大学硕士学位论文,2004.
- [6] 何娜,曾会才.辣椒疫病防治的研究进展[J].现代农业科技,2008(8):64-67.

The Selection of Solid—state Fermentation Medium from Biocontrol Actinomycetes Against *Phytophthora capsici*

YANG Xi—juan, CAI Xiao—jian, CHEN Zhan—quan

(Soil and Fertilizer Institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: we studied the types and ingredients of solid—state fermentation medium of biocontrol actinomycete against *Phytophthora capsici* by solid—state fermentation method. The results showed that two given strains (A3, A5) could produce large amount of living spores cultivated by solid—state fermentation. Corn flour was the best carbon and nitrogen, corn flour V medium was common solid fermentation medium of 2 biocontrol actinomycete.

Key words: *Phytophthora capsici*; biocontrol actinomycete; solid—state fermentation