植物营养与肥料学报 2014,20(3):778-782
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2014.0333

海带渣菌肥作为土壤添加剂对土壤抑制病原真菌活性影响的研究

肖 伟,闫培生*
(哈尔滨工业大学海洋科学与技术学院,山东威海 264209)

摘要:试验以海带渣固体发酵微生物菌肥作为土壤添加剂为研究对象,以土壤浸出液抑制植物病原真菌寄生曲霉的活性来表示土壤自身抑制植物病原真菌的活性。试验通过 Tip-culture 定量检测方法对不同处理组的不同时期土壤浸出液抑制病原真菌寄生曲霉活性进行定量的测定。试验表明,海带渣固体发酵微生物菌肥能显著提高土壤抑制植物病原真菌活性的能力。花生盆栽试验结果表明,海带渣固体发酵微生物菌肥能极显著地提高土壤抑制病原真菌寄生曲霉的能力,其抑制活性对比未添加的 CK 对照组的抑菌活性提高了 37.67%。海带渣固体发酵微生物菌肥作为土壤添加剂提高了土壤抑制病原真菌活性的能力,可用于特异抑菌土壤的培育。

关键词:海带渣;微生物菌肥;土壤浸出液;特异抑菌土壤
中图分类号:S141.9;S154.36 文献标识码:A 文章编号:1008-505X(2014)-0778-05

Inhibitory activity against soil pathogenic fungi of kelp residue as additive in microbial fertilizer

XIAO Wei, YAN Pei-sheng*
(*School of Ocean Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China*)

Abstract: The inhibitory activity of kelp residue soil against pathogenic fungi was investigated with pot experiment. One strain of *Aspergillus parasiticus* was used, and the inhibitory activity of soil leachate against pathogenic fungi *A. parasiticus* was determined using the tip-culture method. The results show that the soil inhibitory activity is significantly increased when the solid fermentation microbial fertilizer containing kelp residue is applied. Compared with the CK treatment, the soil inhibitory activity treated with the kelp residue solid fermentation microbial fertilizer is increased by 37.67%. Therefore, the kelp residue microbial fertilizer can be used as soil additives to improve soil inhibitory activity against pathogenic fungi which is useful to cultivate specifically disease suppressive soil.
Key words: kelp residue; microbial fertilizer; soil leachate; specifically disease suppressive soil

土壤是微生物的大本营,特别是在一些耕作土壤中由于含有各种植物的有机残体及人工施入的大量有机堆肥,土壤中的有机质十分丰富,利于土壤中微生物的生长与繁殖。土壤中的微生物种类与数量虽然众多,但大多数都属于中性微生物,这些微生物对植物并没有明显的益处或者危害;对植物有益和有害的微生物只占土壤微生物的很小部分,但这小部分微生物却与植物病害特别是一些土传病害的发生与流行密切相关。自然界中广泛地存在抑菌型土壤(抑病型土壤),一般认为病原菌不能在这些土壤中定殖,或者能定殖但危害很小或没有危害。抑菌型土壤一般可以分为普通抑菌土壤和特异抑菌土壤,普通抑菌土壤一般不具有转移性,但特异抑菌土壤具有转移性,可以通过一定的农业措施来进行培育[1-3]。

植物病害的生态防治是现代植物病害防治的发

收稿日期:2013-06-12 **接受日期**:2013-12-05
基金项目:威海市科技发展研究计划项目(2010-3-96);哈尔滨工业大学优秀团队支持计划资助。
作者简介:肖伟(1981—),男,四川绵阳人,博士研究生,主要从事植物病害的生物与生态防治,以及有机固体废弃物的资源化利用。E-mail:tuerxiao@yeah.net。 *通信作者 E-mail:psyan6@hotmail.com

展趋势。从植物病害的生态防治角度讲，植物病害的发生可以看成是植物所处的生态系统失衡所致，因此植物病害的生态防治就是生态系统平衡的重建,其防治观点在于将病原微生种群的数量与危害性控制在允许的阈值之内,从而确保植物生态系统的健康发展。可见植物病害的生态防治是一个综合系统的工程,其包括土壤微生态、作物栽培以及植物自身的抗病特性等方面的内容[4-5]。

有机微生物菌肥是一种新型的肥料,其作为土壤添加剂可以改善土壤结构,促进植物的生长,增强植物自身抗性与抗逆能力,提高农作物的品质与产量,所以在农业生产过程中使用有机微生物肥料已经成为了植物病害生态防治的重要措施之一[6-8]。但在有机微生物菌肥,特别是在有机堆肥的使用过程中,有机质本身对土壤微生物群落,尤其是对土壤中有益拮抗微生物群落的影响是一个特别值得关注的问题,即有机质本身是否对土壤中的微生物有一定的选择性促进作用;较有害菌群而言,其是否更能促进有益菌群的生长或者能选择性地促进所引入的有益微生物的生长[9],即这些有机质的施用是否有利于特异型抑菌土壤的培育。有机微生物菌肥的施用对土壤微生物的影响研究,主要集中在对微生物区系特征进行研究,但由于土壤中的绝大多数微生物为中性微生物,所以对微生物区系特征的研究很难准确地反映土壤的抑菌能力,很难对土壤的抑菌能力进行宏观的量化。土壤中微生物的代谢产物要作用于植物,首先这些物质要溶于植物根际土壤的水中,因此土壤浸出液的抑菌活性能反映土壤本身的抑菌活性,所以测定土壤浸出液的抑菌活性,能从宏观上量化土壤的抑菌能力。通过 Tip-culture 定量检测法对土壤浸出液抑菌活性进行检测,可以容易地做到对土壤抑菌能力进行很好的宏观量化[10-11]。

海带渣是加工海带过程中主要固体废弃物。海带渣中的主要成分为海藻纤维、蛋白质、海藻多糖、壳聚糖、多酚、甜菜碱等。作为海带工业中最大宗的固体废弃物,海带渣传统的主要处理方式是采取卫生填埋,但这种方式不仅浪费土壤资源,更浪费了海带渣中本身未被利用的有机质成分,这不符合低碳发展的要求,所以围绕海带渣的资源化利用展开了广泛的研究[12-16]。试验以海带渣固体发酵微生物菌肥为研究对象,研究其作为土壤添加剂对土壤抑菌活性的影响,希望通过施用海带渣固体发酵微生物菌肥能在一定程度上对特异抑菌土壤进行培育,并希望以此作为植物病害生态防治的重要措施之一。

1　材料与方法

1.1　材料

海带渣购于山东某海带加工厂,制造生物肥采用的菌种为本实验室分离得到的一株枯草芽孢杆菌 JGA2(-5)27 -2,供试植物病原真菌为本实验室保存的一株寄生曲霉突变菌株,该突变菌株不能产生黄曲霉毒素,但能积累红色的黄曲霉毒素合成的中间代谢产物。

1.2　海带渣固体发酵微生物菌肥制备方法

生物菌母液制备:将试管斜面上的生防枯草芽孢杆菌 JGA2(-5)27 -2 取一环接种到装有 20 mL GY 培养液(含 20 g/L 葡萄糖和 5 g/L 酵母粉)的三角瓶中在摇床上培养 12 h (35℃、150 rpm),备用。

海带渣固体发酵:将海带渣进行粉碎至 0.5 mm,在培养瓶中装 38 g 干海带渣、2 g 蔗糖与 60 mL 去离子水,pH 值为自然,灭菌。按照 4% 的接种量(4 mL)将制备好的生物菌母液接种到固体培养基中,在 35℃进行固体发酵 8 d。发酵后海带渣固体微生物菌肥中的有效活菌数为每克 3.4×10^{10}个。

1.3　试验设计

1.3.1 海带渣固体发酵微生物菌肥抑菌活性试验

试验采用室内培养方法。从农场中取耕作土壤,用花盆装土,每盆装土 700 g。在土壤中分别加入发酵后的海带渣微生物菌肥 10 g(F10)、20 g(F20)、40 g(F40)与未发酵的海带渣基质 10 g (NF10)、20 g (NF20)、40 g(NF40),以未添加海带渣固体发酵微生物菌肥与未发酵的海带渣基质的处理组为对照 2 (CK2),共 7 个处理,每个处理重复两次。

在培养 30、60、90 d 后收集土壤浸出液。方法:晚上 8 点向各盆土壤中浇 300 mL 去离子水,过夜(12 h)。第二天早上 8 点收集托盘中的浸出液,将收集的浸出液进行离心与微孔滤膜过滤,备用。

病原真菌活性抑制率采用 Tip - culture 培养方法来进行。取将 700 μL 过滤后的土壤浸出液于称重的无菌 5 mL 空枪头中,枪头下端事先用 parafilm 膜包裹以防止漏液,将枪头放入试管架上的玻璃试管中,加入 100 μL GY 培养液,5 μL 的寄生曲霉孢子悬液,枪头上端盖上无菌的塑料盖;将试管架放置在底部铺有湿纱布的泡沫箱中,在 28℃下进行保湿培养 4 ～6 d;培养到期后用针刺穿 parafilm 膜,并在 1000 rpm 条件下离心 40 s 去掉培养枪头中的液体,此时菌丝体保留在枪头中;然后用镊子去掉枪头下端的 parafilm 膜,并对枪头进行称重,培养后枪头的

重量与培养前枪头的重量的差值即为寄生曲霉实际的生长量,计算为土壤抑菌活性(菌丝体生长的抑制率)Iw。Iw = (W1 - W2)/W1 ×100%,其中 W1 为对照菌丝体重量(g),W2 为试验组菌丝体重量(g)。此处对照为病原菌纯培养,即,以 700 μL 无菌水代替土壤浸出液,其它步骤同处理(CK1)。

1.3.2 花生盆栽试验 试验采用盆栽方法,供试作物为花生。从农场中取回耕作土壤 700 g 装于花盆中,设施用 20 g 海带渣固体发酵微生物菌肥与 20 g 未发酵的海带渣基质(60% 含水量,未添加蔗糖)两个处理,以未添加海带渣固体发酵微生物菌肥与未发酵的海带渣基质的处理组为对照,每处理设 3 次重复。每个花盆中播 5 粒花生种;播种后 70 d 取土壤浸出液进行抑菌活性的 Tip - culture 测定(图 1)。

2 结果与分析

2.1 海带渣固体发酵微生物菌肥对土壤抑菌活性的影响

试验通过 Tip-culture 的培养方法对土壤浸出液抑制病原真菌寄生曲霉活性进行定量检测,检测结果如表 1。试验结果表明,施用海带渣菌肥能显著地提高土壤的抑菌活性,且在处理 30 d 后的测定值大于其他时期的测定值。这一现象的原因在于海带渣固体发酵微生物菌肥本身具有较大的抑菌活性,同时其活性能较长时间稳定地存在于土壤中。

在 3 次不同时间所取的样本中,处理 F20 与处理 F40 的抑制病原真菌的活性均高于同一时期的其他处理,两处理间差异不显著。30 d 后,处理 F20 与 CK2、NF10 差异显著,与 CK1、NF40 差异极显著;处理 F40 与 CK2 差异显著,与 CK1、NF10、NF40 差异极显著。60 d 后,处理 F20 与 CK2、F10、NF10、NF20 差异显著,与 CK1 差异极显著;F40 与 NF10 差异显著,与 CK1 差异极显著。90 d 后,处理 F20 与 CK2、F10、NF10 差异显著,与 CK1 差异极显著;处理 F40 与处理 NF20 差异显著,与 CK1、CK2、F10、NF10 差异极显著。试验表明,施用 20 g 或者 40 g 海带渣菌肥均可有效抑制土壤病原真菌的活性。

表 1 不同处理对土壤浸出液病原菌活性的抑制率(%)

Table 1 Inhibitory rate against the pathogenic fungi in the leachate of different treatments

处理 Treat.	加入量(g) Add amount	病原菌活性抑制率 Inhibitory rate		
		30 d	60 d	90 d
CK1	—	—	—	—
CK2	—	35.74 ±4.03	7.93 ±4.14	21.48 ±15.49
F10	10	72.15 ±4.75	7.99 ±8.56	25.14 ±8.63
F20	20	72.31 ±8.30	20.95 ±13.20	41.01 ±3.05
F40	40	75.34 ±10.20	19.56 ±4.65	45.81 ±1.36
NF10	10	25.17 ±17.08	5.68 ±3.43	25.14 ±1.49
NF20	20	44.80 ±3.56	7.47 ±9.87	30.27 ±4.04
NF40	40	-4.67 ±34.17	14.60 ±5.51	36.45 ±11.70

注(Note):CK1—病原菌纯培养对照 No soil leachate; CK2—未添加菌渣肥对照 CK without adding kelp residue; F—发酵菌渣肥 Fermented kelp residue; NF—未发酵菌渣肥 Not fermented kelp residue.

2.2 花生盆栽验证试验

试验通过花生盆栽试验对施用海带渣固体发酵微生物菌肥对土壤抑菌活性的影响做进一步的验证(图 1)。播种 70 d 后,取土壤浸出液进行土壤抑制病原真菌寄生曲霉活性的 Tip-culture 测定,以此对海带渣微生物菌肥能否提高土壤抑制病原真菌活性进行进一步的验证。花生盆栽试验也为海带渣菌肥在农业生产中的推广应用奠定了一定的理论基础。Tip-culture 培养结果如图 2,其菌丝的生长量(3 个重复的平均值):未添加海带渣菌肥和未发酵海带渣的处理的 Tip 管中的寄生曲霉的生长量为(0.0215 ±0.0008) g,施用海带渣菌肥处理的 Tip 管中的寄生曲霉的生长量为(0.0134 ±0.0009) g,施用未发酵海带渣处理的 Tip 管中寄生曲霉的生长

图 1　花生盆栽验证试验

Fig. 1　Peanut pot validation test

[注(Note)：CK—未添加菌渣肥对照 CK without adding kelp residue; F—发酵菌渣肥 Fermented kelp residue; NF—Not fermented kelp residue.]

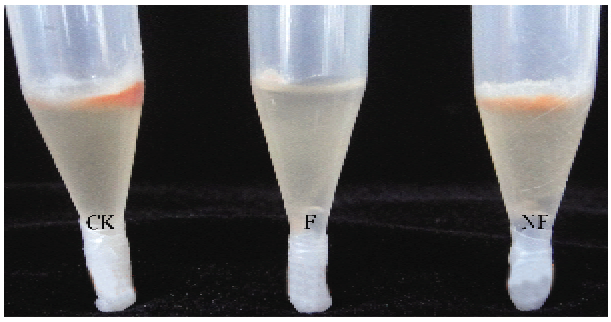

图 2　花生盆栽验证试验土壤浸出液抑制病原真菌寄生曲霉活性的 Tip-culture 检测

Fig. 2　Determination of the inhibitory activity of soil leachate against pathogenic fungi *Aspergillus parasiticus* by using the tip-culture method

[注(Note)：CK—未添加菌渣肥对照 CK without adding kelp residue; F—发酵菌渣肥 Fermented kelp residue; NF—Not fermented kelp residue.]

量为(0.0185 ±0.0014) g。以未施用海带渣菌肥和未发酵海带渣的处理为对照,进行多重比较发现,施用海带渣菌肥的处理能极显著地提高土壤抑制病原真菌的活性;施用海带渣菌肥的处理与施用未发酵海带渣基质的处理差异极显著。施用海带渣菌肥处理的土壤的抑菌活性比对照提高了 37.67%,而施用海带渣处理组的土壤的抑菌活性比对照提高了 13.95%。

利用 SPSS 软件对试验数据进行统计分析,分析采用比较均值单因素 ANOVA。统计分析结果表明,对照与海带渣菌肥之间差异极显著(P =0.000);对照与未发酵海带渣之间差异显著(P =0.015);海带渣菌肥组与未发酵海带渣组之间的差异极显著(P =0.001)。花生盆栽验证试验表明,在栽种了花生的条件下施用海带渣菌肥能极显著提高土壤抑制病原真菌的活性,此研究为海带渣菌肥在农业生产中的推广应用提供了一定的理论基础。

3　讨论

土壤中绝大多数的微生物都属于中性微生物,有益和有害微生物仅占较少一部分,但这小部分的有益和有害微生物却与植物病害的发生与流行密切相关,特别是植物的土传病害。向土壤中添加 pH 调节剂以及施用微生物菌肥或者有机堆肥是植物病害的生态防治的重要措施。施用石灰粉或者硫磺粉等来进行土壤 pH 值的调节,使土壤的 pH 值不利于某一病害的发生,而有利于某一植物的生长,在这种此消彼长的综合作用下提高植物的抗病性;施用微生物菌肥或者有机堆肥可以在一定程度上减少化肥的使用量,有利于调节土壤的理化性质,有利于恢复土壤中微生物的数量与达到土壤中微生态的平衡,利用拮抗微生物减少病原物群体数量,有利于促进植物的生长与提高植物的自身抗性。

本试验以海带渣固体发酵微生物菌肥为土壤添加剂来处理土壤,并希望通过此方法引入特定的生防拮抗细菌来进行特异抑菌土壤的培育。在研究过程中对土壤抑菌活性的量化往往缺少有效的手段,试验通过对土壤浸出液抑菌活性进行 Tip-culture 的定量检测,实现了土壤抑菌活性的量化。此手段简单易行,便于在研究中使用。本研究同时为植物病害生态防治中有效土壤添加剂(微生物菌肥或者有机基质)的筛选提供了简单易行的操作方法,并为海带渣的资源化利用提供了一定的理论基础。

参 考 文 献:

[1] 张瑞福, 沈其荣. 抑病型土壤的微生物区系特征及控制[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 125-132.
Zhang R F, Shen Q R. Characterization of the microbial flora and management to induce the disease suppressive soil [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(5): 125-132.

[2] Westphal A, Becker J O. Transfer of biological soil suppressiveness against *Heterodera schachtii* [J]. Phytopathology, 2000, 90(4): 401-406.

[3] Hornby D. Suppressive soils biological control of plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 1983, 21: 65-85

[4] 谢联辉, 林奇英, 徐学荣. 植病经济与病害生态治理[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(4): 39-42.
Xie L H, Lin Q Y, Xu X R. Plant disease economy and ecologic management of plant diseases[J]. Journal of China Agricultural

University, 2005, 10(4): 39-42.

[5] 叶云峰, 付岗, 缪剑华, 等. 植物病害生态防治技术应用研究进展[J]. 广西农业科学, 2009, 40(7): 850-853.
Ye Y F, Fu G, Miu J H *et al*. Advances in application of ecological control techniques for plant diseases [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009, 40(7): 850-853.

[6] 刘健, 李俊, 葛诚. 微生物肥料作用机理的研究新进展[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(1): 33-36.
Liu J, Li J, Ge C *et al*. Advance in mechanism of microbial fertilizer effect[J]. Journal of Microbiology, 2001, 21(1): 33-36.

[7] 刘鹏, 刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. 农学学报, 2013, 3(3): 26-31.
Liu P, Liu X L, Current research status and prospect of microbial fertilizer in China[J]. Journal of Agronomy, 2013, 3(3): 26-31.

[8] 闫海洋, 吴海燕, 李锋, 等. 几丁质微生物肥料在农业上的应用[J]. 吉林农业科学, 2012, 37(6): 35-38.
Yan H Y, Wu H Y, Li F *et al*. Application of chitin microbial fertilizers in agriculture[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2012, 37(6): 35-38.

[9] 阿格里斯著;沈崇尧主译. 植物病理学(第5版) [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009. 289-290.
George N A. Plant Pathology (Fifth Ed.) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009. 289-290.

[10] Shi C J, Yan P S, Wan K *et al*. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production by geocarpospheric bacterial strains[J]. Journal of Earth Sciences, 2010, 21: 306-308.

[11] Yan P S, Gao X J, Wu H Q *et al*. Isolation and screening of biocontrol bacterial strains against *Aspergillus parasiticus* from groundnut geocarposphere[J]. Journal of Earth Sciences, 2010, 21: 309-311.

[12] 周楠, 马杰, 张淑平, 等. 海带渣生产有机肥的工艺研究[J]. 化学工程与装备, 2011, (3): 11-13.
Zhou N, Ma J, Zhang S P *et al*. Study on production of organic fertilizer with kelp residue [J]. Chemical Engineering and Equipment, 2011, (3): 11-13.

[13] 张俊杰, 段蕊, 许可, 等. 海带工业中海带渣应用的研究及展望[J]. 水产科学, 2010, 29(10): 620-623.
Zhang J J, Duan R, Xu K *et al*. Status and development of dealginate residues in kelp industry [J]. Fisheries Science, 2010, 29(10): 620-623.

[14] 甘纯玑, 彭时尧, 施木田, 等. 海带废渣处理条件及其在罗非鱼饲料中的利用[J]. 中国环境科学, 1996, 16(4): 315-320.
Gan C J, Peng S Y, Shi M T *et al*. Recovery of *Laminaria* residue and its utilization in the feed for *Tilapia nilotica* [J]. China Environmental Science, 1996, 16(4): 315-320.

[15] 明凯利, 张梅, 王树春, 等. 利用海带渣生产燃料乙醇的初步研究[J]. 化工进展, 2013, 32(3): 570-574.
Ming K L, Zhang M, Wang S C *et al*. A preliminary study on production of fuel ethanol from kelp residue [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(3): 570-574.

[16] 温谨, 郑洲, 缪锦来, 等. 利用海带渣制备药用辅料微晶纤维的研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2012, 31(1): 15-19.
Wen J, Zheng Z, Miao J L *et al*. Study on the preparation of pharmaceutical excipient microcrystalline cellulose using kelp residue[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2012, 31(1): 15-19.