

烟草青枯病拮抗菌培养条件的研究

李红丽, 郭夏丽, 王 岩*

(郑州大学 化工学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 为了开发有效防治烟草青枯病的生物有机肥, 对与烟草青枯病拮抗效果较好的 3 株拮抗菌 T3, T4, T5 进行了培养条件研究, 结果表明, 3 种菌最适培养条件为 35℃, pH 7.5, 振荡培养 28 h 时产菌量最多, 4~28 h 为对数生长期。同时考察了拮抗菌利用堆肥生长的情况, 3 种菌均可利用堆肥生长, 随着堆肥量的增多, 生长量增加, 如果同时适当增加培养基中的碳氮比, 菌的生长更好。

关键词: 烟草青枯病; 拮抗菌; 培养条件

中图分类号: S435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)01-0064-03

Studies on Culture Conditions for Suppressive Bacteria against Tobacco Wilt

LI Hong-li, GUO Xia-li, WANG Yan*

(College of Chemical Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: To develop a biological manure which could effectively control the tobacco wilt, the cultural conditions of three antagonistic strains (T3, T4 and T5) against tobacco bacterial wilt were studied. The results indicated that the optimal initial pH value was 7.5 and the temperature was 35℃. The three strains reached the growth peak after 28 h, and their logarithm time of growth was in 4–28h. At the same time, the growth of the three strains utilizing compost was reviewed. All the three strains could utilize compost as substrate and grew better with increasing the content of the compost in the culture. If the C/N ratio in culture medium was increased properly, the microbial counts were increased.

Key words: Tobacco bacteria wilt; Suppressive bacteria; Culture conditions

细菌性青枯病是由布克氏杆菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的一种世界性的主要土传植物病害。该病害可在 44 个科中 300 多种植物上发生^[1]。由于该病害为土传病害, 化学药物难以防治, 加之化防易产生抗药性, 且易造成环境污染, 因此, 该病害的生物防治受到国内外研究者的高度重视。以生物农药替代部分化学农药用于作物病虫害的防治, 所生产的产品则更易达到绿色食品的标准^[2-4]。2005 年, 郑州大学环境与生态研究所从烟草青枯病的根际土壤筛选出了几种拮抗菌^[5], 对其中效果较好的 3 种拮抗菌 (T3, T4, T5) 在安徽芜湖和福建邵武

烟叶基地进行了小区防病试验, 发现它们均具有一定的防病效果。另外, 试验证明 3 种拮抗菌之间没有拮抗作用, 可混合培养生产具有生物农药功能的肥料。为了能够成功地利用混合培养大量生产具有生物农药功能的烟草生物肥料, 有必要了解烟草青枯病拮抗菌的培养特性。

1 材料和方法

1.1 材料

拮抗菌为 T3, T4, T5, 3 个菌株均来自烟草青枯病株根际土壤^[5]。基础培养液是牛肉膏蛋白胨

收稿日期: 2007-08-06

基金项目: 国家烟草局科技司资助项目 (110200302006)

作者简介: 李红丽 (1978-), 女, 河南周口人, 讲师, 硕士, 主要从事环境微生物技术研究。

通讯作者: 王 岩 (1965-), 男, 河南台前人, 教授, 博士, 主要从事固体废弃物资源化处理和利用方面的研究。

液体培养基.

1.2 方法

1.2.1 温度对菌株生长的影响 在装有 120 mL 基础培养液的 250 mL 三角瓶中进行接种, 每 100 mL 培养基中分别加入 1 mL 培养了 10 h 的 T3, T4, T5 新鲜菌液, 分别置于 20, 25, 30, 32, 35, 37, 40, 45 °C 下培养, 120 r/min 振荡培养 36 h, 721 可见分光光度分析仪测定 650 nm 处的吸光度值, 每一处理重复 3 次取平均值. 根据细菌数目与吸光度值的关系(细菌数= kA , k 为常数, A 为吸光度值)^[9], 采用稀释平板菌落记数法和血球记数板记数两种方法, 算出 3 种菌株菌数与吸光度值的关系常数 k_1 , k_2 , k_3 , 然后据此常数求得细菌数.

1.2.2 生长曲线测定 采用基础培养基, 在装有 120 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中进行接种, 每 100 mL 培养基中分别加入 1 mL 培养了 10 h 的 T3, T4, T5 新鲜菌液, 35 °C, 120 r/min 条件下振荡培养 40 h, 每 2 h 取 1 次样, 721 可见分光光度分析仪测定 650 nm 处的吸光度值. 确定菌生长曲线中的各个时期.

1.2.3 不同装液量对菌株生长的影响 将 60, 80, 120, 160 mL 的基础培养液分别装入 250 mL 三角瓶中, 每 100 mL 培养基中分别加入 1 mL 培养了 10 h 的 T3, T4, T5 新鲜菌液, 于 35 °C, 120 r/min 振荡培养 36 h, 取样测定 650 nm 处的吸光度值.

1.2.4 培养基 pH 值对菌株生长的影响 用灭菌的 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别将基础培养液的 pH 调至 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 和 10.0. 每 250 mL 三角瓶加 120 mL 培养液, 每 100 mL 培养基中分别加入 1 mL 培养了 10 h 的 T3, T4, T5 新鲜菌液, 在 35 °C, 120 r/min 条件下振荡 36 h, 取样测定 650 nm 处的吸光度值.

1.2.5 培养基成分对菌株生长的影响 为了进一步做拮抗菌堆肥试验, 考察了培养基中加入不同量的堆肥对 3 种菌生长的影响, 设 4 种培养基组合, 各培养基成分见表 1, 基础培养基成分减半, 加入堆肥, 堆肥量逐渐增加, 随着 4 号培养基调整堆肥的碳

表 1 各种培养基成分 (g/L)				
培养基	蔗糖	牛粪堆肥	蛋白胨	牛肉膏
1 #	5	100	2.5	1.5
2 #	5	150	2.5	1.5
3 #	5	200	2.5	1.5
4 #	15	200	4	1.5

氮比. 培养基加热 5 min 后, 过滤, 取上清液调 pH 为 7.5, 以 100 mL 培养基加入 1 mL 培养了 10 h 的 T3, T4, T5 新鲜菌液, 35 °C, 120 r/min 条件下振荡 36 h, 分别取样测定 650 nm 处的吸光度值.

2 结果与分析

2.1 温度对菌株生长的影响

温度是影响微生物生长的最主要的因素之一, 微生物的生长代谢都在一定的温度范围内进行. 温度对 3 种拮抗菌生长的影响结果见图 1, 从图 1 可以看出, 拮抗菌在 20 ~ 40 °C 均能生长, 但当温度升至 45 °C 时该菌已不能生长. 其中 T5, T4 最适生长温度为 35 °C, T3 在 30 ~ 37 °C 范围内生长没有太大差别, 所以这 3 株拮抗菌的混合培养温度可选定为 35 °C. 另外, 通过试验得到 3 种细菌的关系常数 k_3 , k_4 , k_5 分别为 1.07×10^8 , 1.313×10^9 , 8.35×10^8 .

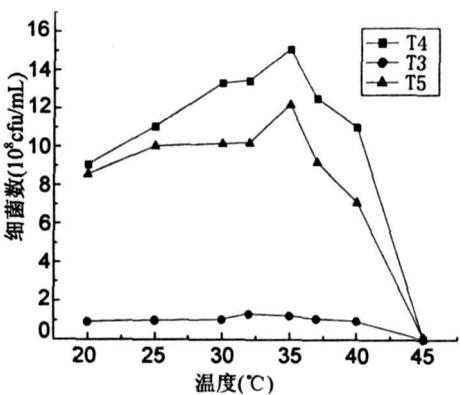


图 1 培养温度对 3 种拮抗菌生长的影响

2.2 生长曲线的测定

从图 2 可看出, 0 ~ 4 h 内菌体生长处于延滞期; 4 ~ 28 h 内菌体处于对数生长期; 29 ~ 36 h 内为稳定生长期; 36 h 以后则为衰退期. 3 种菌的生长比较同步, 这对以后 3 株菌混合培养条件的控制比较有利.

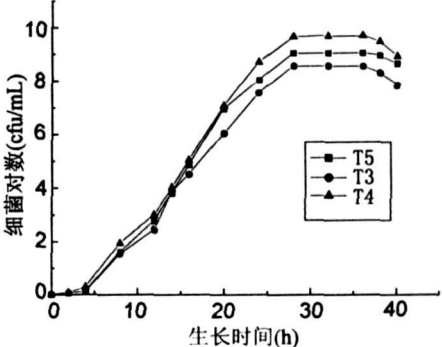


图 2 3 种拮抗菌的生长曲线

2.3 不同装瓶量对菌株生长的影响

从表 2 可以看出, 250 mL 三角瓶中装入 120 mL 培养液时, T5 和 T4 拮抗菌生长的菌量最多, 而 T3 菌的最佳装瓶量是 80 mL, 这说明 3 种菌生长均需要一定量的氧气, 但是 T3 菌需氧量更大。如果接入堆肥培养时, T3 菌应尽量接在堆肥表面。

表 2 不同的装瓶量对 3 种拮抗菌的影响

项目	装瓶量(mL)				
	60	80	100	120	160
T5 菌生长量($\times 10^8$ cfu/mL)	4.66	4.81	5.22	7.95	4.60
T3 菌生长量($\times 10^7$ cfu/mL)	3.85	5.59	4.31	2.79	1.74
T4 菌生长量($\times 10^9$ cfu/mL)	2.52	3.58	4.85	5.2	4.01

2.4 pH 值对菌株生长的影响

微生物生长均需要适宜的 pH, pH 值过低或过高都会抑制菌体的生长。从图 3 可看出, 3 种拮抗菌在 pH 7.0~8.0 均能生长良好, T5 和 T3 菌生长的最佳 pH 为 7.0, T4 生长的最佳 pH 为 7.5, 混合培养时初始 pH 可在 7.5。

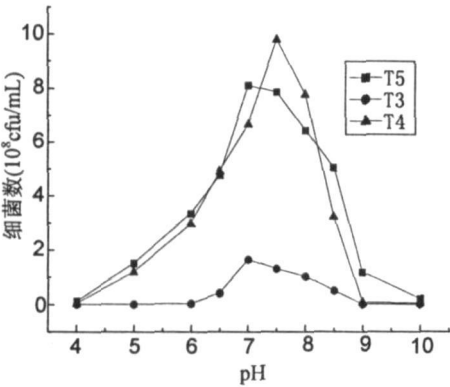


图 3 不同 pH 值对 3 种拮抗菌生长的影响

2.5 培养基成分对菌株生长的影响

由表 3 得知, 随着堆肥量的增加, 拮抗菌的浓度逐渐增加, 说明堆肥中还存在有一定量的供菌体生长的营养物质。由于在 4 #培养基中提高了碳氮

比, 结果 3 种拮抗菌的浓度均比不调整碳氮比的培养基高, 表明碳氮比也是影响 3 种拮抗菌生长的重要因素, 因此, 在利用堆肥培养拮抗菌时, 需要适当调整堆肥的碳氮比。

表 3 不同培养基对拮抗菌生长的影响 (10⁸ cfu/mL)

培养基	T5	T3	T4
1 #	4.20	0.283	5.23
2 #	7.72	0.420	9.26
3 #	12.24	0.863	0.12
4 #	25.10	1.865	29.86

3 小结

确定了 3 种拮抗菌的培养条件, 培养温度为 35 ℃, pH 为 7.5, 可以利用调整碳氮比的牛粪堆肥来培养拮抗菌, 3 种菌培养 28 h 均能达到稳定期, 36 h 以后开始衰退。在此条件下混合培养的拮抗菌, 其拮抗效果会比单一菌的好。培养条件的确定为拮抗菌的中试生产提供了依据, 为 3 种菌的推广应用打下了基础。

参考文献:

[1] 罗宽, 王庄. 利用拮抗 *Pseudomonas. spp.* 和无致病力 *P. solanacearum* 防治青枯病的研究[J]. 植物病理学报, 1983, 13(1): 51—55.

[2] 罗战勇, 陈元生, 周会光. 防治烟草青枯病的药剂筛选试验[J]. 广东农业科学, 2000(1): 42—43.

[3] 陈永惠, 黄福新. 烟草青枯病药剂防治试验[J]. 广西植保, 1996(4): 23—25.

[4] 卢洪兴, 曾军, 邱志丹. 烟草青枯病发生与药剂防治研究[J]. 福建农业学报, 1996, 11(3): 41—45.

[5] 李清飞, 李红丽, 王岩, 等. 烟草青枯病的分离及其拮抗菌的筛选[J]. 河南农业科学, 2006(1): 51—53.

[6] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.