



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101948780 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201010268495. 8

C12R 1/07(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 01

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 3182 2009. 07. 09

CN 101671633 A, 2010. 03. 17, 全文.

CN 101805716 A, 2010. 08. 18, 全文.

CN 1597642 A, 2005. 03. 23, 全文.

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗 1 号

审查员 高欣

(72) 发明人 沈其荣 梅新兰 徐阳春 杨兴明  
冉炜

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限  
公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C05F 11/08(2006. 01)

C05F 17/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

防治连作辣椒疫病的拮抗菌及其微生物有机肥料

(57) 摘要

本发明涉及能克服或消除辣椒疫病的拮抗菌及其生产的微生物有机肥料,属于农业集约化生产技术。本发明分离到了对辣椒连作疫病病原卵菌有显著拮抗作用的拮抗菌(短小芽孢杆菌 NJLZ-8),该拮抗菌与有机肥混合制成微生物有机肥料,肥料中含有  $1 \times 10^8$  个/g 以上的拮抗微生物数量、全氮含量为 4 ~ 5% (90% 以上为有机氮),总氮磷钾养分为 6 ~ 10%、有机质含量为 30 ~ 35%。试验表明,这种微生物有机肥料施入土壤后能够使拮抗菌迅速繁殖,在土壤中形成优势群,在辣椒疫病严重的土壤中对辣椒疫病的生物防治率达 80% 以上。在还没有形成连作障碍的土壤上长期施用本微生物有机肥料能在很大程度上防止辣椒疫病的发生。



对照

拮抗菌 NJLZ-8

1. 一种能防治连作辣椒疫病的拮抗菌 NJLZ-8, 属于短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), 于 2009 年 7 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 菌种保藏号为 CGMCC NO. 3182;

NJLZ-8 的主要生物学特性为: 革兰氏染色阳性  $G^+$ , 产芽孢, 细胞为杆状, 好氧或兼性厌氧生长, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 淀粉水解阴性, V. P. 反应阳性, 甲基红试验阴性, 发酵葡萄糖产酸不产气, 不能发酵木糖、L-阿拉伯糖、甘露醇, 不能利用柠檬酸盐, 硝酸还原酶阳性, 明胶水解阳性, 卵磷脂酶阴性, 不分解纤维素。

2. 用权利要求 1 所述拮抗菌生产的防治连作辣椒疫病的微生物有机肥料, 其特征在于: 该肥料中含有  $1 \times 10^8$  个/g 以上的拮抗菌 NJLZ-8, 全氮质量比含量为 4 ~ 5%, 全氮中质量比 90% 以上为有机氮, 总氮磷钾养分质量比为 6 ~ 10%, 有机质质量比含量为 30 ~ 35%。

3. 权利要求 2 所述微生物有机肥料的生产方法, 包括:

1) 将权利要求 1 所述的拮抗菌 NJLZ-8 接种到 PDA 培养液, 进行液体发酵生产, 发酵生产的条件为: 培养温度范围 30 ~ 35°C, 搅拌速度为 180 ~ 300 转/分钟, 发酵中后期形成芽孢, 使发酵液中含菌或芽孢量  $\geq 1 \times 10^{10}$  个/ml;

2) 将拮抗菌 NJLZ-8 发酵液分别与腐熟后的猪粪堆肥和菜粕微生物酶解混合物进行固体发酵, 每吨固体有机物料中加入 NJLZ-8 发酵液 50L, 固体发酵过程中每天翻堆 1 次, 使固体发酵温度不超过 50°C, 发酵 5 天后结束, 使拮抗菌 NJLZ-8 含量达到  $1 \times 10^8$  个/g 以上, 获得猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥; 其中菜粕的微生物酶解混合物制备方法为, 将保藏号为 CGMCC NO. 1543 的嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 菌株 37-1 发酵液加入到菜粕原料中, 调节含水量 55-65% 和 pH 6.0-7.5, 进行开放式固体发酵, 待发酵温度上升至 50°C 时立即开始翻堆, 以后每天翻堆, 使堆温始终维持在 35-50°C 共 5 天, 固体发酵开始后, 堆物的 pH 会不断上升, 每次翻堆时用含酸液体调节含水量和 pH, 使它们分别维持在 55-65% 和 6.0-7.0, 发酵终止时再用含酸液体进行喷洒, 直至堆物 pH 调整为 5.0, 再进行低温干燥或自然凉干, 即为菜粕的微生物酶解混合物;

3) 然后将固体发酵的猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥按体积比 60 : 40 的比例充分混合后熟 2 天, 后熟过程中翻堆 2 次, 将后熟物低温干燥至 30% 的含水量, 包装出厂即为能防除连作辣椒疫病的微生物有机肥。

4. 根据权利要求 3 中所述微生物有机肥料的生产方法, 其中步骤 1) 所用 PDA 培养液配制方法为: 用 200g 土豆削皮后切成小块放到水里煮, 沸腾后煮 30min, 经过滤后滤液中加 20g 普通蔗糖, 定容至 1000ml, pH 值调至 7.2-7.4, 121°C 灭菌 20min。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述微生物有机肥料的生产方法, 其中步骤 2) 所用腐熟后的猪粪堆肥发芽指数为 98% 以上, 有机肥质量比含量  $\geq 35\%$ , 有机氮质量比含量为 1.2-2%, 含水量质量比 25-30%。

6. 权利要求 2 所述微生物有机肥料在防治连作辣椒疫病中的应用。

## 防治连作辣椒疫病的拮抗菌及其微生物有机肥料

### 一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种能防治连作辣椒疫病的拮抗菌及其微生物有机肥料,属于农业集约化生产技术,专用于克服和消除连作辣椒疫病问题。

### 二、背景技术

[0002] 辣椒原产于中南美洲热带和亚热带地区,现在在我国各地普遍栽培,成为我国栽培面积最大的蔬菜作物之一,更是重要的出口创汇优势经济作物。随着栽培年限的增加,辣椒种植区土传病害大规模发生,特别是设施生产的产业化、专一化、规模化等经营模式的出现,使土传病害更趋严重。辣椒疫病由卵菌病原体辣椒疫霉引起,是辣椒生产上最严重的土传性病害,从苗期到结果期都有发生。传统的化学防治方法会对环境及人类造成负面影响,如果没有防治该病害的有效方法与途径,这对中国的辣椒产业和人民的的生活将产生很大影响。我们的研究表明,连作作物疫病的关键问题不是养分缺乏或不平衡,也不是土壤次生盐渍化问题,而是土壤中的微生物区系及其次生物质的致毒问题。

[0003] 另一方面,水稻、小麦、玉米、油菜等作物秸秆就地焚烧、规模化养殖后的畜禽粪便随地弃置等不仅严重污染了环境,也极大地浪费了能作为有机肥和生物有机肥产品的原料;大量的养分资源(C、N、P、K、S及微量元素)流失于土壤-植物系统之外,明显地削弱了我国农业可持续发展的能力。如何将从土壤中因作物收获而取走的营养元素最大限度地归还到土壤中去,唯一的途径就是将这些固体有机废弃物制成商品有机肥料再施入土壤。如果将这些固体有机废弃物经过高温发酵合成高品位的有机堆肥,再用作功能菌的载体,所制成的微生物有机肥料功能明确,将会有很好的应用前景。

### 三、发明内容

#### [0004] 1. 技术问题

[0005] 本发明的目的在于提供一种能防治连作辣椒疫病的拮抗菌及其微生物有机肥料,使连作辣椒疫病的防治效率达到80%以上,使大量的设施农业土壤和露地辣椒连作障碍土壤得到生物修复,确保集约化农业的顺利发展。

#### [0006] 2. 技术方案

[0007] 一株能克服或消除连作辣椒疫病的拮抗菌NJLZ-8,该微生物属革兰氏染色阳性的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),2009年7月9日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,菌种保藏号为CGMCC NO. 3182,主要生物学特性为:主要生物学特性为革兰氏染色阳性(G<sup>+</sup>),产芽孢。细胞为杆状,好氧或兼性厌氧生长,接触酶阳性,氧化酶阴性,淀粉水解阴性,V.P. 反应阳性,甲基红试验阴性,发酵葡萄糖产酸不产气,不能发酵木糖、L-阿拉伯糖、甘露醇,不能利用柠檬酸盐,硝酸还原酶阳性,明胶水解阳性,卵磷脂酶阴性,不分解纤维素。

[0008] 用上述拮抗菌生产的防除连作辣椒疫病的微生物有机肥料,该肥料中含有 $1 \times 10^8$ 个/g以上的拮抗菌NJLZ-8,全氮质量比含量为4~5%(90%以上为有机氮)、总氮磷钾养

分为 6 ~ 10%、有机质含量为 30 ~ 35%。

[0009] 所述微生物有机肥料的生产方法,包括:

[0010] 1) 将拮抗菌 NJLZ-8 接种到 PDA 培养液,进行液体发酵生产,发酵生产的条件为:pH 生长范围自然,培养温度范围 30 ~ 35℃,搅拌速度为 180 ~ 300 转 / 分钟,发酵中后期形成芽孢,使发酵液中含菌或芽孢量  $\geq 1 \times 10^{10}$  个 / ml。所用 PDA 培养液配制方法为,以配制 1L 培养基为例:用 200g 土豆削皮后切成小块放到水里煮,沸腾后煮 30min,经过滤后滤液中加入 20g 普通蔗糖,定容至 1000ml, pH 值调至 7.2-7.4,121℃ 灭菌 20min。

[0011] 2) 将拮抗菌 NJLZ-8 发酵液分别与腐熟后的猪粪堆肥和菜粕微生物酶解混合物进行固体发酵,每吨固体有机物料中加入拮抗菌液 50L,固体发酵过程中每天翻堆 1 次,使固体发酵温度不超过 50℃,发酵 5 天后结束,使拮抗菌 NJLZ-8 含量达到  $1 \times 10^8$  个 / g 以上,获得猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥,所用腐熟后的猪粪堆肥发芽指数为 98% 以上,有机质质量比含量  $\geq 35\%$ ,有机氮质量比含量为 1.2-2%,含水量质量比 25-30%。其中菜粕的微生物酶解混合物制备方法为,将保藏号为 CGMCC NO. 1543 的嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 菌株 37-1 发酵液加入到菜粕原料中,调节含水量 55-65% 和 pH 6.0-7.5,进行开放式固体发酵,待发酵温度上升至 50℃ 时立即开始翻堆,以后每天翻堆,使堆温始终维持在 35-50℃ 共 5 天,固体发酵开始后,堆物的 pH 会不断上升,每次翻堆时用含酸液体调节含水量和 pH,使它们分别维持在 55-65% 和 6.0-7.0,发酵终止时再用含酸液体进行喷洒,直至堆物 pH 调整为 5.0 左右,再进行低温干燥或自然凉干,即为菜粕的微生物酶解混合物。

[0012] 3) 然后将固体发酵的猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥按体积比 60 : 40 的比例充分混合后熟 2 天,后熟过程中翻堆 2 次,将后熟物低温干燥至 30% 的含水量,包装出厂即为能防治连作辣椒疫病的微生物有机肥。

[0013] 所述微生物有机肥料可专用于防治连作辣椒疫病。

[0014] 3. 有益效果

[0015] 本发明涉及一种能克服或消除连作辣椒疫病的微生物有机肥料及其生产方法,利用猪粪堆肥和菜粕微生物酶解氨基酸混合物,再与拮抗菌液混合后制成微生物有机肥料,其产品与目前市场上的产品相比具有如下优点:

[0016] 1) 肥料产品中含有抑制辣椒疫病病原卵菌生长的专一性高效菌株(短小芽孢杆菌 NJLZ-8),其抑制效果非常显著,肥料中该高效菌株的含量达到  $1 \times 10^8$  个 / g 以上,施入土壤后能形成优势群,并在土壤中存活下来。

[0017] 2) 肥料产品中含有丰富的可溶性有机碳和有机氮,能给功能菌提供十分优越的生长环境,极大地提高了拮抗菌在土壤中的定殖和发挥功能的能力。

[0018] 3) 本发明产品有机磷和有机氮含量特别高,均达到 4%。本产品原料之一为猪粪,总磷含量很高,而且生物有效性特别高,在该微生物有机肥料产品中无需添加任何含磷化肥,使用本产品后能使作物顺利度过苗期磷素敏感期。相比之下,含磷化肥施入土壤后生物有效性较差;本产品中有机氮能达到 4% 以上(大部分为氨基酸和小分子多肽),确保了肥料氮素持续稳定的供应,使所种作物生长和抗逆能力大大增强。

[0019] 4) 研究表明,在连作辣椒的土壤上施用本产品后,能显著降低辣椒疫病的发病率,生物防治率达 80% 以上,并且植株长势良好(图 2)。连续施用本肥料的土壤,对连作

辣椒疫病的生物防治率更高。

#### 四、附图说明

[0020] 图 1 拮抗菌株 NJLZ-8 的平板拮抗效果

[0021] 图 2 盆栽效果 注:1. CK(有连作辣椒疫病土壤) 2. CK+ 常规有机肥 3. CK+ 拮抗菌 NJLZ-8 菌液 4. CK+ 拮抗菌 NJLZ-8 经二次发酵的有机肥(本发明肥料产品)

#### 五、具体实施方式

[0022] (一) 菌株的分离和鉴定

[0023] 采集已经发生辣椒疫病的植株,采用疫霉选择性培养基从发病辣椒的茎的病健交界部位分离获得病原菌,并验证其致病性。然后以辣椒疫病病原菌为指示菌,从连作辣椒疫病发病田块中的健康植株根际土壤中分离拮抗菌。然后通过盆栽试验复筛高效拮抗菌株,最终获得拮抗菌 NJLZ-8 并进行鉴定,菌种于 30%甘油中 -70℃ 保存。平板对峙试验结果发现拮抗菌 NJLZ-8 对病原菌的抑制率达到 68% (如图 1)。

[0024] 拮抗菌 NJLZ-8 属于短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*),其主要生物学特性为:革兰氏染色阳性 ( $G^+$ ),产芽孢。细胞为杆状,好氧或兼性厌氧生长,接触酶阳性,氧化酶阴性,淀粉水解阴性, V. P. 反应阳性,甲基红试验阴性,发酵葡萄糖产酸不产气,不能发酵木糖、L-阿拉伯糖、甘露醇,不能利用柠檬酸盐,硝酸还原酶阳性,明胶水解阳性,卵磷脂酶阴性,不分解纤维素。

[0025] (二) 菌剂生产

[0026] 1) 将拮抗菌 NJLZ-8 接种到 PDA 培养液,进行液体发酵生产,发酵生产的条件为:pH 生长范围自然,培养温度范围 30 ~ 35℃,搅拌速度为 180 ~ 300 转/分钟,发酵中后期形成芽孢,使发酵液中含菌或芽孢量  $\geq 1 \times 10^{10}$  个/ml。所用 PDA 培养液配制方法为,以配制 1L 培养基为例:用 200g 土豆削皮后切成小块放到水里煮,沸腾后煮 30min,经过滤后滤液中加入 20g 普通蔗糖,定容至 1000ml, pH 值调至 7.2-7.4, 121℃ 灭菌 20min。

[0027] 2) 将拮抗菌 NJLZ-8 发酵液分别与腐熟后的猪粪堆肥和菜粕微生物酶解混合物分别进行固体发酵,每吨固体有机物料中加入拮抗菌液 50L,固体发酵过程中每天翻堆 1 次,使固体发酵温度不超过 50℃,发酵 5 天后结束,使拮抗菌含量达到  $1 \times 10^8$  个/g 以上,获得固体发酵的猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥。所用腐熟后的猪粪堆肥发芽指数为 98% 以上,有机质质量比含量  $\geq 35\%$ ,有机氮质量比含量为 1.2-2%,含水量质量比 25-30%。

[0028] 其中菜粕的微生物酶解混合物制备方法为(公知公用,见发明专利 ZL200610086126.0,一种农用氨基酸的生物制取方法及其肥料产品),将保藏号为 CGMCC NO. 1543 的嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 菌株 37-1 发酵液加入到菜粕原料中,调节含水量 55-65% 和 pH 6.0-7.5,进行开放式固体发酵,待发酵温度上升至 50℃ 时立即开始翻堆,以后每天翻堆,使堆温始终维持在 35-50℃ 共 5 天,固体发酵开始后,堆物的 pH 会不断上升,每次翻堆时用含酸液体调节含水量和 pH,使它们分别维持在 55-65% 和 6.0-7.0,发酵终止时再用含酸液体进行喷洒,直至堆物 pH 调整为 5.0 左右,再进行低温干燥或自然凉干,即为菜粕的微生物酶解混合物(含氨基酸的混合材料)。

[0029] 3) 然后将猪粪堆肥微生物有机肥和菜粕酶解混合物微生物有机肥按体积比 60 : 40 的比例充分混合后熟 2 天, 后熟过程中翻堆 2 次, 将后熟物低温干燥至 30% 的含水量, 包装出厂即为能防治连作辣椒疫病的微生物有机肥产品。

[0030] 上述防除连作辣椒疫病微生物有机肥料, 该肥料产品中含有  $1 \times 10^8$  个 /g 以上的拮抗菌 NJLZ-8、全氮质量比含量为 4 ~ 5% (90% 以上为有机氮)、总氮磷钾养分质量比为 6 ~ 10%、有机质质量比含量为 30 ~ 35%。

[0031] (三) 盆栽试验

[0032] 盆栽试验中, 辣椒品种为苏椒五号, 采用健康水稻土育苗至 6 ~ 8 片真叶时, 移栽至小塑料盆中。连作辣椒疫病严重的土壤采自安徽阜南县。每盆装连作辣椒疫病严重的土壤 3kg, 拮抗菌 NJLZ-8 菌液处理以  $10^8$  cfu/g 土均匀拌入连作辣椒疫病土壤中, 本发明肥料产品以 2% 的使用量 (w/w) 均匀拌入病土中。每个处理 3 组重复, 每组重复 6 株辣椒。培养时保持各处理土壤中湿度、温度一致。移栽 35d 后, 统计发病情况, 测定各项指标。

[0033] 结果表明, 连作土壤的发病率为 88%, 并且存活植株长势矮小, 生长缓慢; 连作土壤中接种拮抗菌 NJLZ-8 菌液处理的发病率为 25%, 防治率达 72%, 连作土壤中施用本发明肥料产品处理的发病率为 16%, 防治率达 82% (表 1), 并且植株长势良好 (图 2)。说明本产品能有效的抑制辣椒疫病的发生, 提高辣椒疫病的防治的防治效果。

[0034] 连作土壤中对处理处理的辣椒产量仅为  $4\text{g} \cdot \text{pot}^{-1}$ , 而连作土壤中施用本发明肥料产品处理的产量为  $43.92\text{g} \cdot \text{pot}^{-1}$ , 增产达 9.95 倍。连作土壤的辣椒地上部鲜重为  $19.60\text{g}/\text{株}$ , 干重为  $4.10\text{g}/\text{株}$ , 而连作土壤中施用本发明肥料产品处理的辣椒鲜重为  $43.92\text{g}/\text{株}$ , 干重为  $12.91\text{g}/\text{株}$  (表 2), 生物量差异显著; 连作土壤中施用本发明肥料产品处理较对照处理, 叶片净光合速率、蒸腾速率显著增加 (表 3), 有利于植物光合产物的积累和储藏, 从而提高辣椒产量和生物量。这些结果表明, 本产品除了能有效的降低辣椒疫病的发生外, 还能降低或消除病原菌对辣椒生长产生的抑制作用, 显著的促进辣椒的生长。

[0035] 表 1 盆栽试验辣椒疫病发病率及防治效果

[0036]

处理	发病率 (%)	防治效果 (%)
CK (连作辣椒疫病土)	88.22±5.39	-
CK+普通有机肥	67.78±1.92	23.16±2.18
CK+NJLZ-8 菌体菌剂	24.78±7.18	72.13±8.07
CK+本发明肥料产品	15.67±1.73	82.37±1.95

[0037] 表 2 盆栽试验辣椒产量和生物量

[0038]

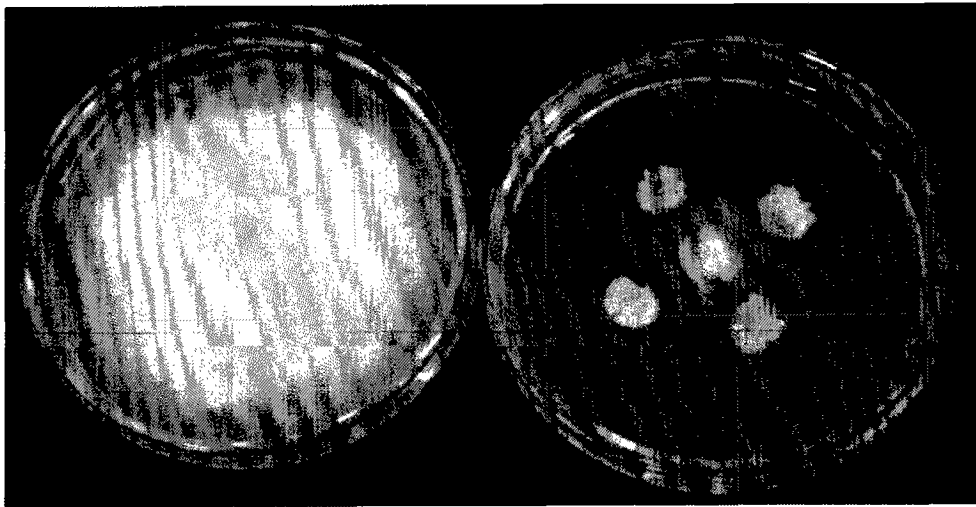
处理	产量 (g·pot <sup>-1</sup> )	鲜重 (g)	干重 (g)	株高 (cm)
CK(连作辣椒疫病土)	4.01±0.49	19.60±2.51	4.10±0.90	25.64±0.87
CK+普通有机肥	14.13±0.88	34.86±2.48	5.64±1.01	27.63±0.34
CK+NJLZ-8 菌体菌剂	33.41±4.75	57.03±4.84	9.21±0.81	34.72±0.83
CK+本发明肥料产品	43.92±2.65	71.58±5.81	12.91±0.83	37.28±3.93

[0039] 表 3 盆栽试验辣椒功能叶片光合指标

[0040]

处理 Treatment	净光合速率 ( $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	气孔导度 ( $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	胞间 CO <sub>2</sub> 浓度 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	蒸腾速率 ( $\text{mmolH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
CK (连作辣椒疫病土)	10.26±2.15	0.31±0.14	312.83±10.96	2.75±0.80
CK+普通有机肥	11.12±2.82	0.21±0.12	280.28±22.50	2.30±0.89
CK+NJLZ-8 菌体菌剂	15.35±2.06	0.46±0.06	321.33±3.20	3.62±0.30
CK+本发明肥料产品	16.99±1.56	0.63±0.13	316.30±6.58	4.56±0.47

[0041] 本发明专利从连作土壤的微生物区系这一关键问题着手,研制出一种能显著降低连作辣椒疫病发病率的微生物有机肥料产品,防治率达 80%以上。本肥料产品的作用机制在于本肥料产品提供的功能菌及其有效碳和有效氮源给连作障碍土壤有益微生物区系的培育提供了很好的条件,使之迅速恢复土著有益微生物和外源功能菌微生物的生态及其食物链;另一方面,本肥料产品中含有较高含量的有机氮和有机磷,这些营养物质对连作障碍土壤中作物的生长十分有利,大大提高了作物的立苗率和抗逆能力。



对照

拮抗菌 NJLZ-8

图 1

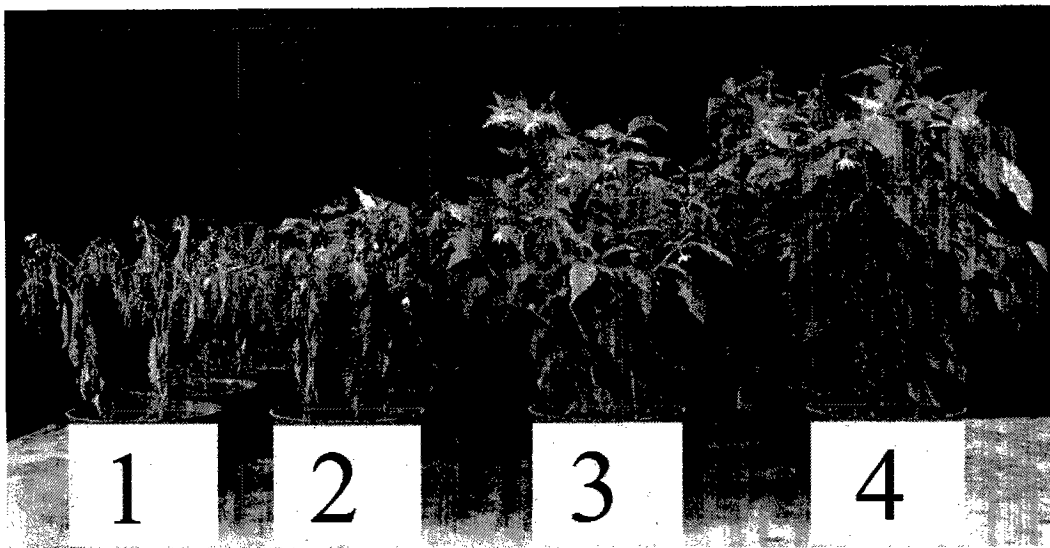


图 2