

猪粪沼液防治辣椒疫病机理研究*

——沼液中铵与腐殖酸的作用

曹云 常志州** 马艳 杨豪 付广青

(江苏省农业科学院农业资源与环境研究所 农业废弃物资源化工程技术研究中心 南京 210014)

摘要 为探明猪粪沼液对作物土传病害的防治效果与机制,设纯化肥处理为对照,采用盆栽试验比较了猪粪沼液(ADP1)、外源添加铵沼液(ADP2)、除铵沼液(ADP3)、除腐殖酸沼液(ADP4)施用对辣椒疫病的防治效果。结果表明,猪粪沼液(ADP1)可以显著降低辣椒疫病的发病率(防效 40.8%),去除沼液中的铵或腐殖酸后,对辣椒疫病的防治效果显著下降,其发病率与病原菌对照(PC)无显著差异。定量 PCR 检测结果表明,ADP2 处理土壤疫霉数量最少(2.51×10^3 copies·g⁻¹),ADP3、ADP4 沼液处理的辣椒根际疫霉数量较多,分别为 8.19×10^3 copies·g⁻¹、 1.38×10^4 copies·g⁻¹;土壤中辣椒疫霉菌的数量低于 9.54×10^3 copies·g⁻¹ 时,辣椒疫病发病率与土壤中病原菌数量有较好的对应关系。不同沼液处理对细菌、真菌和放线菌数量的影响不同。病原菌存在下,ADP1 处理的细菌、真菌、放线菌数量均最多,ADP2 处理的真菌数量最少。孢子萌发试验表明,随着铵和腐殖酸处理浓度的增加,对疫霉菌游动孢子萌发的抑制率均逐渐增大。浓度为 500 mg·L⁻¹、1 000 mg·L⁻¹、1 500 mg·L⁻¹ NH₄⁺ 对疫霉菌孢子萌发的抑制率分别为 77.6%、81.8%、95.4%。用浓度为 25 mg(C)·L⁻¹、50 mg(C)·L⁻¹、75 mg(C)·L⁻¹、150 mg(C)·L⁻¹ 的猪粪沼液腐殖酸处理疫霉菌游动孢子 6 h,游动孢子萌发率分别比无菌水对照下降了 27.8%、54.5%、70.0%、87.5%。研究表明铵和腐殖酸可能是沼液的主要抑菌因子,沼液作为土传病害抑制剂具有一定的应用前景。

关键词 猪粪沼液 铵 腐殖酸 辣椒 疫病 疫霉菌 游动孢子

中图分类号: S18 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2013)09-1119-08

Control mechanism of phytophthora blight of chilli pepper by anaerobically digested pig slurry

— The roles of ammonium and humic acid in biogas slurry

CAO Yun, CHANG Zhi-Zhou, MA Yan, YANG Hao, FU Guang-Qing

(Jiangsu Agricultural Waste Treatment and Recycle Engineering Research Center; Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract Anaerobic digestion is promising in treatments of large amounts of animal manure from animal husbandry. It has been apparent that new methods of utilizing anaerobically digested slurry were needed to achieve sustainable management of husbandry wastes. Anaerobically digested slurry has shown suppressive effects on different soil-borne pathogens and its application to soils has been proposed as a new way to control several plant diseases. The objective of this study was to evaluate the potential use of anaerobically digested pig slurry (ADP) to suppress *Phytophthora capsici*, the causative agent of phytophthora blight in chilli pepper. The study also aimed to clarify the roles of ammonium and humic acid in ADP inhibition of pathogen growth. A pot experiment was conducted to study the effect of untreated anaerobically digested pig slurry (ADP1), ammonium-intensified pig slurry (ADP2), ammonium-removed pig slurry (ADP3) and humic acid-removed pig slurry (ADP4) on controlling phytophthora blight in chilli pepper. The results showed that ADP1 effectively reduced the incidence of phytophthora blight with a relative control efficiency of 40.8%. Disease incidence of plants treated with ADP3 and ADP4 was not significantly different from that of pathogen control (PC).

* 中国博士后科学基金面上项目(2011M500878)和农业部公益性行业专项项目(201203050-1)资助

** 通讯作者: 常志州(1957—), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为农业废弃物资源化利用。E-mail: czhizhou@hotmail.com

曹云(1981—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为农业废弃物资源化利用。E-mail: youngtsao66@126.com

收稿日期: 2013-01-30 接受日期: 2013-04-02

This suggested that removing ammonium or humic acid from ADP significantly reduced ADP control efficiency. Real-time PCR analysis showed that *P. capsici* number in rhizospheric soils of ADP2 was the least (2.51×10^3 copies·g⁻¹), with significantly larger numbers for ADP3 (8.19×10^3 copies·g⁻¹) and ADP4 (1.38×10^4 copies·g⁻¹) treatments. When *P. capsici* density in the soil dropped below 9.54×10^3 copies·g⁻¹, disease incidence became strongly correlated with *P. capsici* count. Different ADPs had different effects on the growth of soil microorganisms. The numbers of soil total bacteria, fungi and actinomycete were largest in ADP1 treatment. The least number of fungi was observed in ADP2 treatment. *In-vitro* experiments showed that NH₄⁺ concentrations of 500 mg·L⁻¹, 1 000 mg·L⁻¹ and 1 500 mg·L⁻¹ reduced zoospore germination by 77.6%, 81.8% and 95.4%, respectively. Zoospore germination rates in treatments with 25 mg(C)·L⁻¹, 50 mg(C)·L⁻¹, 75 mg(C)·L⁻¹ and 150 mg(C)·L⁻¹ of humic acid extracted from ADP1 decreased by 27.8%, 54.5%, 70.0% and 87.5%, respectively. The study suggested that ammonium and humic acid were major ADP inhibitors of *P. capsici* growth. ADP was promising in terms of inhibiting and controlling soil-borne diseases.

Key words Anaerobically digested pig slurry, Ammonium, Humic acid, Chili pepper, Phytophthora blight, *Phytophthora capsici*, Zoospore

(Received Jan. 30, 2013; accepted Apr. 2, 2013)

辣椒疫病是辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leonian)引起的世界性重要土传病害,尤以大棚连作辣椒苗期发作严重,局部严重田块绝收^[1-2]。孢子萌发、菌丝生长是辣椒疫霉菌增殖、疫病蔓延的重要途径,能抑制疫霉菌生长的任何一个阶段都能有效控制辣椒疫病的发生。轮作、选育抗病品种、化学防治和生物防治是控制辣椒疫病的主要措施,但均有不足^[1]。因此,开发新的、更有效的防治辣椒疫病方法刻不容缓。

很多文献报道沼液对多种植物病害有较好的防治效果^[3-4],但由于厌氧发酵原料多样,发酵过程多变,国内外对沼液的研究多停留在肥效和病害防效上,对沼液的主要抑菌成分和抗病机理研究不多。前人通过液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对沼液成分进行了研究,认为沼液中的氨基酸、B族维生素、植物激素^[4]、烷类和酯类^[5-6]可能是沼液抑制病原菌的主要成分。也有研究认为沼液中的拮抗微生物是其抑菌防病的主要因子^[3]。然而,前期研究表明,猪粪沼液厌氧发酵前、后拮抗微生物数量并未增加^[7],已发表资料也显示激素、烷类等物质在沼液中的含量极低^[5-6],猪粪厌氧发酵后 NH₄⁺-N 含量显著增加,成为沼液的主要代谢产物之一^[8-9]。研究表明,铵对大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*)^[10]、腐霉菌(*Pythium ultimum*)、樟疫霉菌(*Phytophthora cinnamomi*)^[11]、寄生疫霉菌(*Phytophthora parasitica*)^[12]等多种植物病原真菌有明显抑制作用。腐殖酸是沼液有机碳的主要部分^[5],腐殖酸类肥料施用于经济作物具有独特的防病治虫效果^[13],能抑制尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、*Pythium ultimum*等多种病原菌的生长^[14-16]。

本研究以畜禽粪便厌氧发酵产生的主要代谢产物铵和腐殖酸为切入点,研究猪粪沼液对辣椒疫霉

菌游动孢子萌发的影响,同时比较沼液原液与除铵、除腐殖酸后沼液的抑菌效果,并通过盆栽试验进行验证,判断沼液中的主要抑菌成分,以期阐明沼液抗病机理,同时为利用沼液开发抑制土传病害制剂提供理论数据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试土壤为采自江苏省农业科学院的水稻土,基础理化性质为:碱解氮 113.97 mg·kg⁻¹、有效磷 106.81 mg·kg⁻¹、速效钾 0.194 g·kg⁻¹、有机质 21.58 g·kg⁻¹、pH 7.20。辣椒品种为“洛椒超级 5 号”,由江苏省淮安市农业科学研究院提供。供试沼液取自本实验室正常产气 3 个月以上的厌氧发酵罐,发酵原料为猪粪。供试病原菌为辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*),对辣椒有强致病性,由本实验室提供。

1.2 试验设计

选用长×宽×高=35 cm×20 cm×15 cm 的塑料盆,每盆装土 2.5 kg。设如下 6 个处理:(1)空白对照(CK),不加病原菌,全部施用化肥,将一定量尿素、磷酸二氢钾和硫酸钾溶于 500 mL 去离子水后均匀拌入土中,使得每盆施肥量为 0.83 g(N)·kg⁻¹(土)、0.28 g(P₂O₅)·kg⁻¹(土)、0.53 g(K₂O)·kg⁻¹(土);(2)病原菌对照(PC),施肥量同处理(1),添加 1 000 个·g⁻¹(土)辣椒疫霉菌孢子;(3)普通沼液(ADP1);(4)外源添加铵沼液(ADP2);(5)除铵沼液(ADP3);(6)除腐殖酸沼液(ADP4);处理(3)、(4)、(5)、(6)的 N、P、K 施用量等于单施化肥的处理,其中沼液提供 50%的 N(0.42 g)和相应的 P、K,剩余的 N、P、K 分别由尿素、磷酸二氢钾和硫酸钾提供。处理(3)、(4)、(5)、(6)病原菌添加量同处理(2),不同沼液的添加量根据其总 N 含量(表 1)计算得到,并保证每个处理土壤含水量一致。土壤、沼液及病原菌充分混匀后 6 d,取 3 株健壮均匀的 6 叶 1 心辣椒苗种

植于盆钵中央, 每个处理种植 10 盆。辣椒移栽 28 d 后统计发病率, 每个处理随机取 5 盆, 并采集根际土样进行微生物分离、计数及 DNA 提取。盆栽试验共进行 2 茬, 分别于 2012 年 9—10 月和 11—12 月在江苏省农业科学院农业资源与环境研究所农业废弃物资源化工程技术研究中心温室内进行。

1.3 沼液制备方法

外源添加铵沼液(ADP2): 根据原始沼液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的含量, 添加硫酸铵使沼液中的 NH_4^+ 浓度达到 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

除铵沼液(ADP3): 取 2 L 原始沼液用 NaOH 调 pH 至 12, 用空气压缩机(排气量为 $30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)间歇曝气, 每次曝气时间为 10 min, 累积曝气时间为 8 h。曝气结束后, 用硫酸回调 pH 至 8.0, 通过测定处理前、后铵态氮含量, 确定铵态氮的去除效果。

除腐殖酸(humic acid, HA)沼液(ADP4): 采用大

孔吸附树脂(AB-8, 上海蓝季科技发展有限公司)动态吸附法^[17], 吸附柱为内径 3 cm、长 20 cm 的玻璃柱。称取 5.0 g 经预处理后的湿树脂湿法装入层析柱中, 以 $2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速, 将 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后的沼液上清液上柱吸附, 每 10 mL 收集 1 管流出液, 待吸附饱和后, 依次用 2.5 BV 的乙醇和 5%NaOH 洗脱层析柱, 并测定流出液中腐殖酸碳的浓度, 同时用硫酸调 pH 至 8.0。

1.4 各处理的理化性质

总固体浓度采用常规分析方法; 水溶性有机碳、总氮、总磷、总钾的测定参照废水监测分析方法^[18]; 铵态氮采用连续流动分析仪(FIAstarTM 5000 systems, FOSS, America)测定。腐殖酸碳采用 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7+0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaOH}$ 提取, 总有机碳分析仪(Multi N/C 3100, Analytic jena)测定^[19]。

各处理的理化性状见表 1。

表 1 各试验处理的基本理化性状
Table 1 Physical and chemical characteristics of different treatments

处理 Treatment	处理代码 Code of treatment	总固体 Total solids (%)	水溶性 有机碳 Dissolved organic C ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	总氮 Total N ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	总磷 Total P ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	总钾 Total K ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	pH	腐殖 酸碳 Humic acid-C ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白对照 Blank control	CK	0	0	4 150	0	1 400	2 650	—	0
病原菌对照 Pathogen control	PC	0	0	4 150	0	1 400	2 650	—	0
原始沼液 Untreated ADP	ADP1	0.6	1 083	722	390	231	312	7.78	691
增铵沼液 Ammonium intensified ADP	ADP2	0.6	1 083	1 250	1 000	231	312	7.34	691
除铵沼液 Ammonium removed ADP	ADP3	3.0	1 848	213	4	338	312	7.20	818
除腐殖酸沼液 Humic acid removed ADP	ADP4	0.2	936	159	58	78	352	8.01	311

ADP: 猪粪沼液, 下同。Anaerobically digested pig slurry. The same below.

1.5 辣椒疫霉菌孢子萌发试验

辣椒疫霉菌游动孢子悬液的制备方法: 辣椒疫霉菌在 V8 培养基中培养 5 d, 打孔取菌落边缘 20 个菌丝块($\phi=5\ \text{mm}$)放入装有 15 mL 灭菌水培养皿中, 长有菌丝的一面朝上, 液面淹没菌丝块, 光暗交替培养(12 h/12 h)2 d。再将菌丝块转移入含有 5 mL 灭菌的试管中, 放入 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱 30 min 后取出, 待释放出游动孢子, 挑出菌丝块, 配成游动孢子悬浮液, 用血球计数板计数, 得出孢子浓度为 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

不同沼液对疫霉菌孢子萌发的影响试验: 试验前将原始沼液、外源添加铵沼液、除铵沼液和除腐殖酸沼液分别在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜后备用。处理为 $10\ \mu\text{L}$ 辣椒疫霉菌游动孢子悬液与 $5\ \mu\text{L}$ 不同沼液上清液混匀, 对照为 $10\ \mu\text{L}$ 游动孢子悬液与 $5\ \mu\text{L}$ 无菌水混匀后加到有凹面、经灭菌处理的载玻片上, 每个处理 3 次重复。载玻片放入培养皿中, 培养皿底部用无菌湿润

滤纸保湿, 将培养皿于 $28\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养 6 h 后, 在 40 倍镜下分别观察各处理游动孢子的萌发状况, 在每个视野中随即查数 100 个游动孢子, 计算游动孢子萌发率。观察过程中及时补水保湿。

铵对疫霉菌孢子萌发的影响试验: 根据本实验室前期对江苏省 21 个规模化养殖场内大型沼气工程中沼液样本的理化特性分析, 猪场沼液铵态氮的含量介于 $290\sim 1\ 322\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 呈中性至微碱性^[8], 因此采用外源添加不同量的硫酸铵至 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.5)中, 得到不同 NH_4^+ 浓度的系列溶液, 并采用上述方法将硫酸铵溶液与孢子悬液混合, 设置混合液中 NH_4^+ 浓度分别为 $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1\ 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以磷酸缓冲液为对照, 观察各处理孢子萌发率。

腐殖酸对疫霉菌孢子萌发的影响试验, 将从猪粪沼液中提取到的腐殖酸类物质冷冻干燥后, 溶于无菌水中, 设置 4 个腐殖酸碳浓度梯度, 依次为 $25\ \text{mg}(\text{C})\cdot\text{L}^{-1}$ 、

50 mg(C)·L⁻¹、75 mg(C)·L⁻¹、150 mg(C)·L⁻¹，设置无菌水为对照，按上述方法观察不同浓度腐殖酸对疫霉菌游动孢子萌发的影响。

1.6 病情调查方法

辣椒幼苗移栽后，每天观察辣椒生长情况。移苗 9 d 后发现病原菌对照处理开始萎蔫发病，之后每天调查记录各处理辣椒疫病发病情况，至试验结束时，计算发病率和防治效果。发病率=病株数/总株数×100%；防治效果=(病原菌对照发病率-处理发病率)/病原菌对照发病率×100%。

1.7 土壤总 DNA 的提取与荧光定量 PCR 分析

每茬栽培结束后取辣椒根际土壤晾干、研碎并过 1 mm 筛，装入聚乙烯袋保存在-70 °C 冰箱中用于 DNA 提取。土壤 DNA 的提取采用 FastDNA[®] Spin soil kit (MP Biomedicals, Solon, OH) 试剂盒。

荧光定量 PCR 扩增体系为：1x SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2x)(Takara 宝生物工程有限公司)混合液 10 μL，上游引物 CAPFW(5'-TTAGTTGGGGTCTTGTACC-3')、下游引物 CAPRV1(5'-CCTCCACAACCAGCAACA-3')^[20]各 0.5 μL，DNA 模板 2 μL，ddH₂O 7 μL。反应程序：95 °C 预变性 2 min，94 °C 变性 30 s，60 °C 退火延伸 34 s，40 个循环。每个样品设 3 个重复，并以无菌水代替疫霉菌 DNA 为空白对照，于 ABI 7500 Real-time PCR system 扩增仪上分析。

荧光定量 PCR 标准曲线的制作：以疫霉菌基因组 DNA 为模板，用引物 CAPFW/CAPRV1 进行 PCR 扩增，扩增产物经纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中，通过蓝白斑试验筛选阳性转化菌。筛选出的阳性转化菌经质粒提取试剂盒纯化后，经核酸定量仪(NanoDrop 2000, Thermo Scientific)测定质粒浓度并转换为拷贝数，为 8.85×10^{10} copies·μL⁻¹。用上述反应条件对样品和重组质粒标准品进行 10 倍梯度稀释($8.85 \times 10^2 \sim 8.85 \times 10^6$ copies·μL⁻¹)进行扩增，在退火和延伸阶段(60 °C)同步实时采集荧光。扩增结束后立即进行融解曲线分析，以验证扩增的特异性，同时绘制标准曲线(图 1)，标准曲线方程为 $y = -3.326x + 40.101$ ， $R^2 = 0.992$ ，扩增效率为 99.8%。

1.8 根际微生物的分离与计数

每茬栽培结束后取辣椒根际土壤，土壤中可培养微生物数量的测定采用稀释平板法^[21]。细菌的分离与计数采用牛肉膏蛋白胨培养基，放线菌采用高氏 1 号培养基，真菌采用马丁氏培养基。

1.9 数据分析

原始数据分析采用 Microsoft Excel 2007 软件，不同处理的方差分析和差异显著性检验(LSD)采用 SPSS 11.0 软件，显著检验水平为 $P < 0.05$ 。

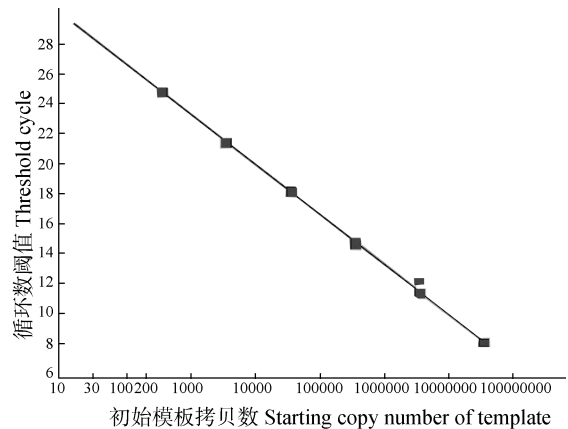


图 1 荧光定量 PCR 不同疫霉菌起始模板量和 CT 值的标准曲线

Fig. 1 Real-time PCR standard curve of the *Phytophthora capsici* DNA input versus the corresponding threshold cycle (CT) values

2 结果与分析

2.1 不同猪粪沼液对辣椒疫病的防治效果

从表 2 可以看出，2 季盆栽试验中，除空白对照(CK)外，其他处理辣椒植株均出现不同程度疫病症状，且不同处理间的发病率呈现相似趋势。平均发病率最高的处理为病原菌对照(PC)(90.0%)和除腐殖酸沼液(ADP4)处理(86.7%)，增铵沼液(ADP2)处理的发病率最低(43.4%)，防治效果达 51.8%；其次为原始沼液处理(ADP1)，平均防效为 40.8%；沼液除铵或除腐殖酸后，对辣椒疫病的防治效果显著下降，发病率与病原菌对照(PC)无显著差异。说明猪粪沼液中的铵和腐殖酸对沼液防治辣椒疫病起重要作用。

2.2 不同猪粪沼液对土壤细菌、真菌、放线菌及疫霉菌数量的影响

从辣椒根际土壤微生物数量结构可以看出(表 3)，不同沼液对细菌、真菌和放线菌数量的影响存在差异。病原菌存在下，ADP1 处理的细菌、真菌、放线菌数量最多，ADP1 处理根际细菌数量分别为 PC、ADP2、ADP3、ADP4 的 1.95 倍、1.85 倍、3.75 倍和 1.52 倍；ADP1 处理根际放线菌数量分别为 PC、ADP2、ADP3、ADP4 的 5.18 倍、11.34 倍、14.39 倍、4.89 倍；ADP2 (增铵沼液)处理的真菌数量最低，分别比 PC、ADP1、ADP3、ADP4 处理的真菌数量低 77.81%、83.94%、49.85%、78.79%。

荧光定量 PCR 对 6 个处理根际土壤中辣椒疫霉分析结果表明，除 CK 外，其他 5 个处理均能检测到荧光信号，疫霉菌的数量为 $2.51 \times 10^3 \sim 1.38 \times 10^4$ copies·g⁻¹。除 PC 外，4 种不同沼液处理的发病率与病原菌数量呈现较好的对应关系：4 个处理中，发病率最低的 ADP2(增铵沼液)处理，其疫霉数量最少，显著低于 PC、ADP3、ADP4 处理，其次为 ADP1 和 ADP3；

表 2 不同猪粪沼液对辣椒疫病的防治效果
Table 2 Control effects of different treatments of anaerobically digested pig slurry on pepper blight

处理 Treatment	第 1 季 First season		第 2 季 Second season		平均 Mean	
	发病率 Disease incidence (%)	防治效果 Control efficacy (%)	发病率 Disease incidence (%)	防治效果 Control efficacy (%)	发病率 Disease incidence (%)	防治效果 Control efficacy (%)
CK	0	—	0	—	0c	—
PC	100.0	0	80.0	0	90.0±14.1a	0b
ADP1	53.3	46.7	53.3	33.3	53.3±0.0b	40.8±9.5a
ADP2	46.7	53.3	40.0	50.0	43.4±4.7b	51.8±2.3a
ADP3	66.7	33.7	80.0	0	73.4±9.4a	18.4±23.8b
ADP4	80.0	20.0	93.3	-16.6	86.7±9.4a	3.7±25.9b

同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$), 下同。Different small letters in the same column mean significant difference among treatments at 0.05 level. The same below.

表 3 不同猪粪沼液对辣椒根际微生物数量及疫霉菌游动孢子萌发的影响
Table 3 Effects of different treatments of anaerobically digested pig slurry on microbial populations of chilli pepper rhizosphere soil and zoospore germination of *Phytophthora capsici*

处理 Treatment	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu·g ⁻¹)	真菌 Fungi ($\times 10^3$ cfu·g ⁻¹)	放线菌 Actinomycete ($\times 10^5$ cfu·g ⁻¹)	疫霉菌转录间隔区数量 <i>P. capsici</i> number of internal transcribed spacer region (copies·g ⁻¹)	孢子萌发率 Zoospore germination rate (%)
CK	10.10±1.32a	4.73±0.24b	7.82±0.19b	0	—
PC	4.22±0.54b	7.75±1.33a	5.06±0.10c	9 540±476b	37.62±9.0a
ADP1	8.25±3.90a	10.71±1.67a	26.20±2.31a	4 363±339c	3.84±5.4bc
ADP2	4.45±2.08ab	1.72±0.11d	2.31±1.54d	2 510±295c	1.35±1.9c
ADP3	2.20±0.52c	3.43±0.31c	1.82±0.09d	8 190±765b	13.39±1.2b
ADP4	5.41±2.10b	8.11±0.24a	5.35±0.18c	13 800±1 147a	34.25±2.0a

发病率较高的 ADP4(除腐殖酸沼液)处理, 其辣椒根际疫霉数量最高, 分别比 ADP1、ADP2、ADP3 处理高 216%、449%、68% (表 3)。

2.3 不同猪粪沼液对辣椒疫霉菌孢子萌发的影响

不同猪粪沼液处理对辣椒疫霉菌孢子萌发产生不同的影响(表 3)。ADP2 处理的孢子萌发率最低, 与对照相比, 抑制率达 96.4%, 其次为 ADP1 处理、ADP3 处理, 抑制率分别为 89.8%、64.4%, 而 ADP4 处理的孢子萌发率则与对照无显著差异。由此可见, 猪粪沼液对辣椒疫霉菌孢子萌发产生显著抑制, 但沼液去除铵和腐殖酸后这种抑制作

用变小甚至消失。

2.4 铵和腐殖酸对辣椒疫霉菌游动孢子萌发的影响

由图 2 可知, 铵和源于猪粪沼液的腐殖酸对疫霉菌游动孢子的萌发均产生一定的抑制作用。且抑制效果随浓度的增加而更显著。当培养液 pH 为 7.5、NH₄⁺ 浓度为 500 mg·L⁻¹、1 000 mg·L⁻¹、1 500 mg·L⁻¹ 时, 根据 Henderson-Hasselbalch 公式^[10], 计算得对应的 NH₃ 浓度分别为 9 mg·L⁻¹、17 mg·L⁻¹、26 mg·L⁻¹。试验结果表明, NH₄⁺ 浓度达到或超过 500 mg·L⁻¹, 各处理的疫霉菌游动孢子萌发率均显著低于对照, 抑制率分别为 77.6%、81.8%、95.4%(图 2A)。当猪粪沼液腐殖酸

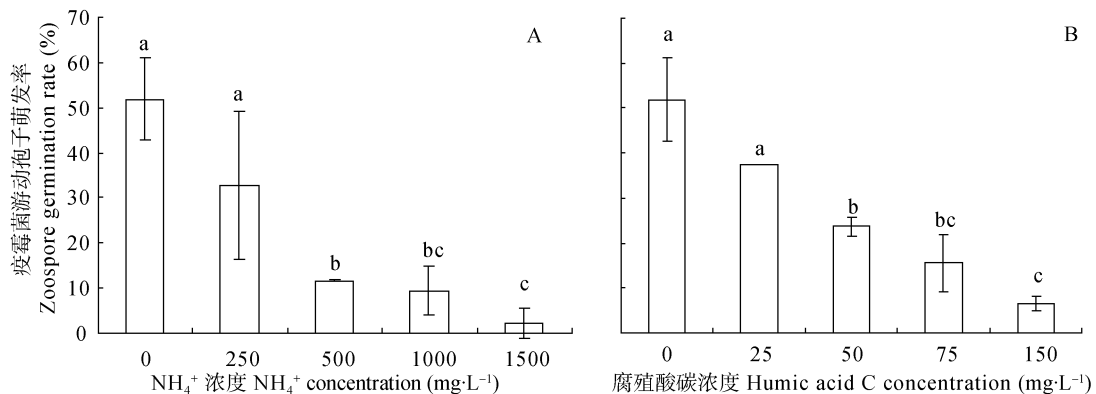


图 2 铵(A)和源于猪粪沼液的腐殖酸(B)对辣椒疫霉菌游动孢子萌发的影响
Fig. 2 Effects of ammonium (A) and humic acid from anaerobically digested pig slurry (B) on zoospore germination of *Phytophthora capsici*

碳浓度为 25 mg·L⁻¹、50 mg·L⁻¹、75 mg·L⁻¹、150 mg·L⁻¹ 时, 与对照(无菌水)相比, 疫霉菌游动孢子萌发率分别下降 27.8%、54.5%、70.0%、87.5%, 随着腐殖酸碳处理浓度的增加, 抑制率逐渐增大, 当浓度达到或超过 50 mg·L⁻¹ 时, 与对照之间存在显著差异(图 2B)。

3 讨论

利用沼气工程对畜禽养殖废弃物进行厌氧消化, 在获得沼气的同时, 其大量的厌氧发酵残留物, 即沼渣和沼液, 如不予妥善处理, 将会导致“二次污染”, 严重制约规模化养殖场沼气工程的发展。目前沼液主要用于施肥、浸种和作为饲料^[22], 很多文献报道沼液对多种农作物病原菌有较好的抑制作用^[3-4,22]。本试验表明, 猪粪沼液(ADP1)对辣椒疫霉菌游动孢子的萌发有抑制效果。施用猪粪沼液(ADP1)可以显著降低辣椒疫病的发病率, 实际应用时直接施用沼液简单方便, 而且沼液中含有丰富的氮、磷、钾等营养元素, 可达到“药肥双效”。

有机物的厌氧发酵是在厌氧条件下由发酵细菌和产甲烷细菌协同作用的一个错综复杂的微生物代谢过程, 在此过程中, 随着碳水化合物的分解转化, 碳氮比逐渐降低, 有机酸大量消耗, 铵态氮含量逐渐升高, 其含量占沼液全氮含量的 70%以上^[8], 且沼液一般呈弱碱性, 因此沼液中存在一定量的氨, 而氨在土壤中大量累积是高氮有机物料杀灭土壤病原微生物的主要机制之一^[10,12]。Chun 和 Lockwood^[11] 研究认为, 土壤中 *P. cinnamomi* 和 *P. parasitica* 数量的下降与氨对土壤溶液中孢子囊形成和游动孢子释放的抑制作用有关。病原菌与土壤溶液中的氨接触时间越长, 孢子囊中游动孢子释放率越低。不同类型病原菌对氨的敏感程度不同, 培养基中氨浓度分别为 4 mg·L⁻¹ 和 6 mg·L⁻¹ 时, *P. cinnamomi* 和 *P. parasitica* 游动孢子释放率均低于 1%, 17 mg·L⁻¹ 的氨使 *P. parasitica* 厚垣孢子萌发率降低了 90%^[12]。这与本试验研究结果相符, 猪粪沼液对辣椒疫霉菌游动孢子萌发具有显著抑制作用: 500 mg·L⁻¹ NH₄⁺ (对应 NH₃ 浓度为 9 mg·L⁻¹) 处理下, 辣椒疫霉菌游动孢子萌发率较对照下降 77.6%, 说明 NH₃ 不仅可抑制疫霉属病原真菌游动孢子的释放, 还可抑制其萌发, 进而降低土壤中病原菌的数量。氨抑制病原微生物的机理在于高氮有机物料施入土壤后, 由于氨化作用促使土壤 pH 在短时间内升高, pH 的升高使得土壤溶液中 NH₃ 的浓度迅速升高, 因此能有效杀灭病原菌^[12,23]。盆栽试验中, 原始沼液(ADP1)和增铵沼液(ADP2, NH₄⁺ 浓度为 1 000 mg·L⁻¹) 处理的病原菌浓度均显著低于 PC(病原菌对照)处理, 但

ADP1 与 ADP2 之间病原菌数量无显著差异, 这与孢子萌发试验结果符合, 即 500 mg·L⁻¹ 与 1 000 mg·L⁻¹ NH₄⁺ 处理之间游动孢子萌发率也无显著差异, 只有当培养基中 NH₄⁺ 浓度提高到 1 500 mg·L⁻¹ 时, 游动孢子萌发率才显著低于 500 mg·L⁻¹ NH₄⁺ 处理。因此, 尽管除腐殖酸沼液中也含有 NH₄⁺, 但由于浓度尚未达到抑制疫霉菌的阈值, 同时该沼液中还含有大量的水溶性有机碳, 对病原菌的生长有一定刺激作用, 因此检测到的疫霉菌数量比病原菌对照(PC)还高。辣椒疫病属土传病害, 是否发病及发病严重程度除受环境因素如温度、水分影响外, 还取决于根际土壤中的病原菌数量。试验结果还表明, 当土壤中病原菌浓度低于 9.54×10³ copies·g⁻¹, 辣椒疫病的发病率与土壤中病原菌数量有较好的对应关系, 这与吕卫光等^[24]、凌宁等^[25] 研究结果一致。尽管除腐殖酸沼液处理的病原菌数量高于 PC 处理, 两者发病率无显著差异。说明当土壤中疫霉菌浓度高于一定阈值时, 菌量的继续增加不会明显提高疫病发病率。刘长华等^[26] 研究也表明, 土壤中病原菌接种浓度在 0.05% 和 0.5% 时, 玉米丝黑穗病的田间发病率不存在显著差异, 这与本研究结果相符。

Hoitink 等^[27] 研究还表明, 有机物料施入土壤会刺激土壤中有益微生物的生长, 有益微生物通过拮抗、营养竞争、生态位竞争也能降低土壤病原微生物的数量, 抑制土传病害的发生。本试验中, 原始沼液和增铵沼液处理土壤的细菌和放线菌数量均显著高于病原菌对照, 而真菌数量较病原菌对照处理有不同程度减少。这可能是因为沼液中的氨不仅对病原微生物有杀灭作用, 而且对土壤中其他真菌生长也有抑制作用^[28]。

腐殖酸是畜禽粪便沼液中有有机碳的主要成分, 不仅可以作为调节剂改善土壤结构, 提高土壤肥力, 还可以作为生物催化剂和生物刺激剂促进植物生长, 提高植物抵御病、虫害能力。相关研究表明, 腐殖酸能刺激土壤中有益微生物的生长和繁殖^[29], 抑制病原微生物的增殖, 具有抑制作物土传病害的能力, 是堆肥提取液抑制植物病害的主要因子之一^[14-16]。Loffredo 等^[16] 研究认为, 从堆肥和土壤中提取出的腐殖酸均对病原真菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 的菌丝生长有显著抑制作用, 浓度越高, 抑制作用越明显。Pascual 等^[14] 研究表明, 施用市政废弃物堆肥及其腐殖酸类物质能显著降低土壤中 *Pythium ultimum* 的数量, 减轻对大豆的侵害。这些研究结果与本试验相符: 当培养液中的腐殖酸浓度高于 50 mg·L⁻¹ 时, 辣椒疫霉菌游动孢子萌发率显著下降, 说明腐殖酸可以通过降低疫霉菌游动孢子萌发率来减少土壤中疫

霉菌数量。盆栽试验进一步验证了腐殖酸的抑菌性能,猪粪沼液中去除腐殖酸后,对辣椒疫病的防效比原始沼液处理降低90.9%,土壤中病原菌数量增加2.16倍。

腐殖酸抑制病原菌的机理目前研究还不深入,多数研究认为腐殖酸的生物活性与其来源、分子量、结构和官能团组成有关。Loffredo等^[16]研究表明,总酸度、羧基和氧元素含量与堆肥腐殖酸的抑菌性能高度相关。Nardi等^[30]、Trevisan等^[31]研究证明了相对于高分子量腐殖酸,低分子量腐殖酸的羧基、酚羟基含量更高,有更强的与金属离子配位的能力,因而生物活性更强。本试验表明猪粪沼液腐殖酸对辣椒疫霉菌孢子萌发有显著抑制作用,其抑菌谱、抑菌活性及与结构的关系还有待进一步研究。

4 结论

从本试验结果来看,猪粪沼液对辣椒疫霉菌游动孢子萌发具有显著抑制作用,而当沼液中的铵或腐殖酸被去除后,这种抑制作用明显减弱,甚至消失。进一步采用离体试验法的结果表明,铵和腐殖酸均具有显著抑菌效果,且随浓度增加而增大,表明畜禽粪便沼液中确实存在对病原微生物具有明显抑制作用的有效化学成分,具有“药肥”合一的功效,铵和腐殖酸是抑制辣椒疫霉菌的主要因子,但由于沼液代谢产物复杂,也不排除可能存在其他一些因素。

参考文献

- [1] Hausbeck M K, Lamour K H. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1292-1303
- [2] 梅新兰, 赵青云, 谭石勇, 等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2652-2658
Mei X L, Zhao Q Y, Tan S Y, et al. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(10): 2652-2658
- [3] 马艳, 李海, 常志州, 等. 沼液对植物病害的防治效果及机理研究 I: 对植物病原真菌的抑制效果及抑菌机理初探[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(2): 366-374
Ma Y, Li H, Chang Z Z, et al. Biocontrol effect and mechanism of biogas slurry on plant disease I: Primary study of growth inhibition: Effects and mechanism on *Phytopathogen Fungi*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2011, 30(2): 366-374
- [4] 张无故, 刘士清, 赖建华, 等. 厌氧消化残留物在防治农作物病虫害中的作用[J]. 中国沼气, 1996, 14(1): 6-9
Zhang W G, Liu S Q, Lai J H, et al. The effects of anaerobic fermentation residue on prevention of diseases and insect pests for crops[J]. China Biogas, 1996, 14(1): 6-9
- [5] 宋成芳, 单胜道, 张妙仙, 等. 畜禽养殖废弃物沼液的浓缩及其成分[J]. 农业工程学报, 2011, 27(12): 256-259
Song C F, Shan S D, Zhang M X, et al. Concentration and determination of composition of biogas slurry[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2011, 27(12): 256-259
- [6] 刘爱民, 徐双锁, 蔡欣, 等. 稻秸蓝藻混合厌氧发酵沼液及其化学物质对尖孢镰刀菌西瓜专化型生长的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(14): 4585-4592
Liu A M, Xu S S, Cai X, et al. Effects of microchemical substances in anaerobic fermented liquid from rice straw and cyanobacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* growth[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(14): 4585-4592
- [7] Cao Y, Chang Z Z, Wang J D, et al. The fate of antagonistic microorganisms and antimicrobial substances during anaerobic digestion of pig and dairy manure[J]. Bioresource Technology, 2013, 136: 664-671
- [8] 靳红梅, 常志州, 叶小梅, 等. 江苏省大型沼气工程沼液理化特性分析[J]. 农业工程学报, 2011, 27(1): 291-296
Jin H M, Chang Z Z, Ye X M, et al. Physical and chemical characteristics of anaerobically digested slurry from large-scale biogas project in Jiangsu Province[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2011, 27(1): 291-296
- [9] Hansen K H, Angelidaki I, Ahring B K. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia[J]. Water Research, 1998, 32(1): 5-12
- [10] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 2002, 92(3): 255-264
- [11] Chun D, Lockwood J L. Reductions of *P. ultimum*, *Thielaviopsis basicola*, and *Macrophomina phaseolina* populations in soil associated with ammonia generated from urea[J]. Plant Disease, 1985, 69: 154-158
- [12] Tsao P H, Oster J J. Relation of ammonia and nitrous-acid suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic-substances[J]. Phytopathology, 1981, 71(1): 53-59
- [13] 江志阳, 尹微, 张雪松. 腐植酸生物肥料在蔬菜上的应用效果[J]. 腐殖酸, 2012(1): 12-16
Jiang Z Y, Yin W, Zhang X S. Application effect of humic acid bio-fertilizer on vegetables growth[J]. Humic Acid, 2012(1): 12-16
- [14] Pascual J A, Garcia C, Hernandez T, et al. Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *P. ultimum*[J]. Microbiological Ecology, 2002, 44(1): 59-68
- [15] Loffredo E, Berloco M, Casulli F, et al. In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum*[J]. Biology and Fertility of Soils, 2007, 43(6): 759-769
- [16] Loffredo E, Berloco M, Senesi N. The role of humic fractions from soil and compost in controlling the growth in vitro of phytopathogenic and antagonistic soil-borne fungi[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 69(3): 350-357
- [17] Thurman E M, Malcolm R L. Preparative isolation of aquatic humic substances[J]. Environmental Science and Technology,

- 1981, 15(4): 463–466
- [18] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- Protection Editorial Board from State Bureau of Environmental. Monitoring and determination methods for water and wastewater[M]. 4th edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002
- [19] Franco-Otero V G, Soler-Rovira P, Hernández D, et al. Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(2): 205–216
- [20] Silvar C, Duncan J M, Cooke D E L, et al. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 112(1): 43–52
- [21] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- Li F D, Yu Z N, He S J. Techniques of agricultural microbiology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1996
- [22] 陶秀萍, 董红敏, 尚斌, 等. 新鲜猪沼液和牛沼液对农作物病原真菌抑制作用的比较研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(7): 1443–1449
- Tao X P, Dong H M, Shang B, et al. Comparison of inhibiting effects between fresh effluents of anaerobically digested pig-gery waste and anaerobically digested dairy waste on plant pathogenic fungi[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(7): 1443–1449
- [23] Gilpatric J D. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendment[J]. *Phytopathology*, 1969, 59: 973–978
- [24] 吕卫光, 戴富明, 张春兰, 等. 设施西瓜连作障碍因子[J]. *北方园艺*, 2004(6): 26
- Lv W G, Dai F M, Zhang C L, et al. The cause of continuous cropping obstacles of watermelon in plastic greenhouse[J]. *Northern Horticulture*, 2004(6): 26
- [25] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5): 1136–1141
- Ling N, Wang Q J, Yang X M, et al. Control of *Fusarium wilt* of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5): 1136–1141
- [26] 刘长华, 王振华. 玉米丝黑穗病田间接种浓度与发病率关系的研究[J]. *玉米科学*, 2008, 16(1): 119–121
- Liu C H, Wang Z H. Study on relationship between the content and incidence in field of head smut in maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2008, 16(1): 119–121
- [27] Hoitink H A J, Stone A G, Han D Y. Suppression of plant diseases by composts[J]. *HortScience*, 1997, 32(2): 184–187
- [28] Nelson E E. Survival of *Poria weirii* in wood buried in urea-amended forest soil[J]. *Phytopathology*, 1975, 65(4): 501–502
- [29] Valdrighi M M, Pera A, Agnolucci M, et al. Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: A comparative study[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1996, 58(2/3): 133–144
- [30] Nardi S, Pizzeghello D, Reniero F, et al. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(2): 639–645
- [31] Trevisan S, Francioso O, Quaggiotti S, et al. Humic substances biological activity at the plant-soil interface[J]. *Plant Signal Behaviour*, 2010, 5(6): 635–643