

文章编号 :1003-8701(2014)02-0061-04

# 两种生防制剂对食用菌杂菌的抑制作用

冀瑞卿<sup>1</sup>,冯冲<sup>2</sup>,柏文博<sup>1</sup>,李玉<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心,长春 130118;2. 北京正兴隆生物科技有限公司,北京 102211)

**摘要:**利用生长速率法和悬滴法,测得生防药剂多粘类芽孢杆菌剂和枯草芽孢杆菌剂对食用菌常染杂菌脉孢霉和青霉菌丝的生长速率和孢子萌发的抑制效果。试验结果显示,两种生防制剂对脉孢霉和青霉有一定的抑制作用,其中,多粘类芽孢杆菌药剂对脉孢霉和青霉孢子萌发的抑制作用明显,抑制率分别为90.44%和65.04%;而枯草芽孢杆菌药剂对脉孢霉和青霉的菌丝生长的抑制效果在处理中表现为最高,抑制率分别为36.29%和46.66%。因此,多粘类芽孢杆菌药剂可以作为杂菌孢子抑制剂,枯草芽孢杆菌药剂可以作为杂菌菌丝生长的抑制剂。

**关键词:**脉孢霉;青霉;多粘类芽孢杆菌;枯草芽孢杆菌;生物防治

中图分类号:S436.46+1

文献标识码:A

## Inhibitory Effects of Two Biological Control Pharmacy on Pathogen in Edible Fungus

Ji Rui-qing<sup>1</sup>, FENG Chong<sup>2</sup>, BAI Wen-bo<sup>1</sup>, Li Yu<sup>1\*</sup>

(1. *Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal, Jilin Agricultural University, Changchun 130118*; 2. *Zhengxinglong Biological Technology Co., Ltd in Beijing, Beijing 102211, China*)

**Abstract:** The inhibitory effects of 2 bactericides were tested by growth rate method and pendant drop method. The component of one bactericide is *Paebacillusni polymyxa*, the other is *Bacillus subtilis*. The results showed that 2 bactericides had inhibitory effects of *Neurospora sp.* and *Penicillium sp.*. The bactericide of *Paebacillusni polymyxa* had good inhibitory effects on spore germination of *Neurospora sp.* and *Penicillium sp.*, the inhibitory rates were 90.44% and 65.04%, respectively. So it can be used as inhibitor of spore germination. The bactericide of *Bacillus subtilis* had good inhibitory effects on mycelia growth of *Neurospora sp.* and *Penicillium sp.*, the inhibitory rates were 36.29% and 46.66%, respectively. Therefore it can be used as the inhibitor of mycelia growth.

**Keywords:** *Neurospora sp.*; *Penicillium sp.*; *Paebacillusni polymyxa*; *Bacillus subtilis*; Biological control

近年来,随着食用菌产业的迅速发展其栽培规模也不断增大,有效控制生产中的病虫害具有重要意义。生产中主要利用化学药剂防治食用菌杂菌,然而近年来化学防治让人们谈之色变,不但污染环境,而且不利于食用菌的可持续发展。本文

选取生产中两种常用生防药剂多粘类芽孢杆菌药剂(主要成分:多粘类芽孢杆菌 *Paebacillusni polymyxa*)和枯草芽孢杆菌药剂(枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*)对食用菌生产中常见杂菌脉孢霉和青霉进行抑制试验,拟从两种生防药剂中找到适合抑制脉孢霉菌和青霉菌的生防药剂及初步了解其抑菌机理,为食用菌病害生物防治的研究奠定基础。

脉孢菌(*Neurospora sp.*)又称链孢霉、串珠霉或红色面包霉。危害食用菌的主要是无性阶段,其生长速度快、生活力强,分生孢子大量产生,若处

收稿日期:2013-08-17

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(cars24)

作者简介:冀瑞卿(1977-),女,讲师,博士,主要从事食药用菌的开发研究。

通讯作者:李玉,男,教授,博士,中国工程院院士,

E-mail:yuli966@126.com

理不正确不及时几天之内可污染整个场地,给生产造成很大的经济损失。近年来,在多个食用菌产区如北京房山、黑龙江尚志、山东淄博、河北平泉、苇河等地,发现此病原菌侵染食用菌菌丝和培养基,造成培养基批量报废、菌袋成品率下降,对食用菌栽培有很大影响<sup>[1]</sup>。

青霉(*Penicillium* sp.)主要危害食用菌的菌丝体。在一定条件下,也能引起香菇、平菇、草菇、金针菇、双孢蘑菇等子实体病害。青霉菌菌丝与食用菌菌落交织起来,形成一层霉层,覆盖料面,阻隔料面空气;同时分泌出毒素,对食用菌的菌丝有致死作用。青霉侵染抑制食用菌菌丝的生长,使之不能形成子实体,即使形成了子实体也会使其变褐色腐烂<sup>[2]</sup>。

多粘类芽孢杆菌(*Paebacillusni polymyxa*)中很多菌株可以作为重要的生防资源,通过菌体产生的肽类、蛋白质类、核苷类等抗菌物质和直接作用于菌体杀死病原菌及通过与植物之间的互作诱导植物产生抗病性物质等抑菌机制,防治多种植物病害并可促进植物生长<sup>[3]</sup>。对番茄青枯病、百合镰刀菌枯萎病、烟草青枯病等多种植物病害均具有良好的防效。美国环境保护署(EPA)已将其列为可商业上应用的微生物种类之一<sup>[4-5]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)应用于植物病害生物防治的研究已经有很多年的历史,目前在黄瓜、辣椒、水稻、小麦、玉米等农作物病害上显出较好的防治效果,如可抑制番茄茎基腐病菌和葡萄灰霉病菌的发生<sup>[6-7]</sup>,此两种微生物作为生防药剂在植物病虫害防治中虽有很好应用,但鲜有其应用于食用菌杂菌脉孢霉和青霉防治的报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试药剂:多粘类芽孢杆菌菌剂,主要成分为多粘类芽孢杆菌(孢子 2 亿个/g);产自浙江省桐庐汇丰生物化工有限公司;枯草芽孢杆菌菌剂:商品名为微生物重茬防腐病壮根剂,主要成分为枯草芽孢杆菌(孢子 1 亿个/g);产自寿光市绿士达生物工程有 限 公 司。

供试脉孢霉和青霉菌株:由吉林农业大学食用菌栽培实验室从污染菌袋经分离、纯化获得。

供试培养基及配方:

固体 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL。

液体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000

mL。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 生长速率法

在无菌条件下,将多粘类芽孢杆菌菌剂配成浓度为 0.001 g/mL、0.002 g/mL、0.01 g/mL(根据药剂推荐剂量)的培养基,将枯草芽孢杆菌菌剂配成浓度为 0.001 g/mL、0.001 25 g/mL、0.002 g/mL(根据药剂推荐剂量)的带药培养基。每浓度设 3 个重复,未加药剂的培养基作为对照组,分别将实现培养好的脉孢霉和青霉利用打孔器取直径 5 mm 的菌饼接种到已制好的平板中央,每浓度 3 个重复,25℃培养,利用十字交叉法测定脉孢霉菌落的生长半径。根据以下公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径}] \times 100\%$$

#### 1.2.2 悬滴法

在无菌操作条件下,制备脉孢霉和青霉的孢子悬浮液(10×40 倍镜下每视野约 50 个孢子),将含多粘类芽孢杆菌菌剂溶于无菌水,配成浓度分别为 0.003 g/mL、0.006 g/mL、0.03 g/mL 的药液备用;将枯草芽孢杆菌菌剂溶于无菌水,配成浓度分别为 0.003 g/mL、0.003 75 g/mL、0.006 g/mL 的药液备用。向已灭菌的容积为 4 mL 的离心管中加入 1 mL 液体 PDA 培养基,1 mL 孢子悬浮液,1 mL 已配好的药液(对照组为 1mL 无菌水),每浓度 3 个重复,置于 27℃培养,约 5~7 h 后即可观察,统计每视野中孢子总数及萌发数。根据公式计算萌发率与抑制率:

$$\text{萌发率} = \text{孢子萌发数} / \text{孢子总数} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = [(\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}) / \text{对照萌发率}] \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉菌丝生长的抑制作用

表 1 多粘类芽孢杆菌药剂对脉孢霉菌丝生长的抑制效果

杂菌	不同处理	菌落生长半径平均值(mm)	菌丝抑制率(%)
脉孢霉	对照组	32.34	—
	0.001	26.43	18.27
	0.002	25.73	20.44
	0.01	22.26	31.17
青霉	对照组	11.53	—
	0.001	10.68	7.37
	0.002	10.17	11.79
	0.01	9.1	21.08

多粘类芽孢杆菌菌剂的 3 种不同浓度(0.001 g/mL、0.002 g/mL 和 0.01 g/mL) 对脉孢霉与青霉的菌丝生长均有不同程度的抑制作用,如表 1。当浓度为 0.01 g/mL 时,多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉的菌丝的抑制作用最明显,抑制率分别为

31.17%与 21.08%,菌丝生长纤细,气生菌丝稀少且分生孢子较少产生,而对照组气生菌丝发达,且大量分生孢子于气生菌丝上产生,如图 1。多粘类芽孢杆菌对青霉生长的抑制率随其浓度的增大逐渐变大,与对照相比分生孢子产生较少,如图 3。

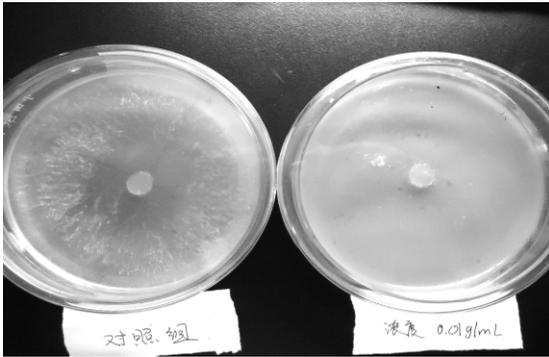


图 1 脉孢霉在含多粘类芽孢杆菌菌剂培养基上的生长状态

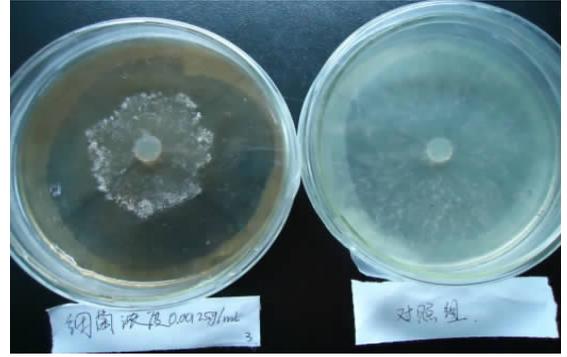


图 2 脉孢霉在含枯草芽孢杆菌菌剂培养基上的生长状态

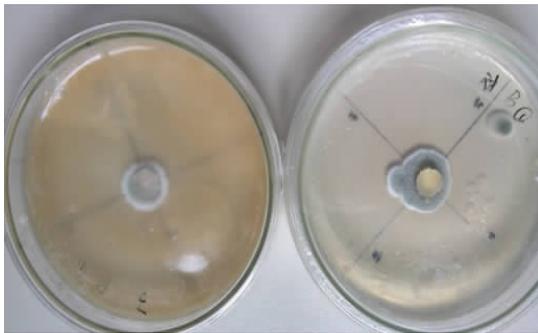


图 3 青霉在含多粘类芽孢杆菌菌剂培养基上的生长状态



图 4 青霉在含枯草芽孢杆菌菌剂培养基上的生长状态

## 2.2 枯草芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉菌丝生长的抑制作用

表 2 枯草芽孢杆菌菌剂对脉孢霉菌丝生长的抑制作用

杂菌	不同处理	菌落生长半径平均值(mm)	抑制率(%)
脉孢霉	对照组	43.45	—
	0.001	36.21	16.67
	0.001 25	33.66	22.53
	0.002	27.68	36.29
青霉	对照组	11.53	—
	0.001	7.34	36.34
	0.001 25	7.15	37.99
	0.002	6.15	46.66

3 种浓度的枯草芽孢杆菌 (0.001 g/mL、0.001 25 g/mL、0.002 g/mL) 药剂对脉孢霉菌丝生长均起到一定的抑制作用,如表 2。抑制率分别为 36.29% (0.002 g/mL) > 22.53% (0.001 25 g/mL) > 16.67% (0.001 g/mL), 随着药剂浓度的增加其抑制率均有不同程度的增加,但在菌落边缘新气生菌丝较多且产生大量的分生孢子,如图 2。3 种浓

度的枯草芽孢杆菌 (0.001 g/mL、0.001 25 g/mL、0.002 g/mL) 菌剂对青霉菌丝生长的抑制效果都较好,抑制率随其浓度的增大逐渐变大,分别为 46.66% (0.002 g/mL) > 37.99% (0.001 25 g/mL) > 36.34% (0.001 g/mL), 浓度为 0.001 g/mL 时抑制效果最好,高于对脉孢霉的抑制率。

## 2.3 多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉孢子萌发的影响

表 3 多粘类芽孢杆菌药剂对脉孢霉与青霉孢子萌发的抑制作用

杂菌	不同处理	孢子萌发抑制率(%)
脉孢霉	对照组	—
	0.001	45.27
	0.002	55.58
	0.01	90.44
青霉	对照组	—
	0.001	52.17
	0.002	54.59
	0.01	65.04

3种浓度的多粘类芽孢杆菌药液对脉孢霉与青霉菌孢子的萌发都有一定的抑制作用,如表3。多粘类芽孢杆菌对脉孢霉孢子萌发的抑制作用更为明显,在药剂浓度为0.01 g/mL时抑制率达90.44%,同浓度下的药剂对青霉菌孢子萌发的抑制率达到65.04%。而空白对照的孢子全部萌发,且多数长成菌丝团。

#### 2.4 枯草芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉菌孢子萌发的抑制作用

表4 枯草芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉菌孢子萌发的抑制作用

	不同处理	孢子萌发抑制率(%)
脉孢霉	对照组	—
	0.001	12.93
	0.00125	37.64
	0.002	64.07
青霉	对照组	—
	0.001	16.59
	0.00125	23.13
	0.002	40.16

3种浓度的枯草芽孢杆菌菌剂对脉孢霉与青霉菌孢子的萌发都有一定的抑制作用,如表4。枯草芽孢杆菌对脉孢霉孢子萌发的抑制作用较明显,在药剂浓度为0.02 g/mL时抑制率达64.07%。

枯草芽孢杆菌菌剂抑制青霉菌孢子萌发的试验中,随菌液浓度的逐渐增大对青霉菌孢子的抑制率增大,在浓度为0.002 g/mL时,抑制率最大为40.16%,且处理24 h后观察结果显示,孢子悬浮液内的孢子萌发的菌丝多数较短,且极少数成菌丝团,而空白对照的孢子萌发多数长成菌丝团。

### 3 结论与讨论

通过试验可知生防药剂多粘类芽孢杆菌(主要成分:多粘类芽孢杆菌)和微生物重茬防腐病壮根剂(主要成分:枯草芽孢杆菌)对食用菌常染杂菌脉孢霉的生长速率有一定的抑制作用,其抑菌率随浓度的增加而渐大,但抑制程度并不十分显著,两种药剂最大的生长速率抑制率分别为31.17%和36.29%,试验观察到在两种药剂的影响下脉孢霉菌丝生长更纤细,多粘类芽孢杆菌药剂还可明显抑制孢子的产生,在孢子萌发试验中也证实了多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉孢子的抑制率达到90.44%,对于脉孢霉这种产孢能力特别强的杂菌而言,控制孢子萌发的作用更重要,因此,可以

将多粘类芽孢杆菌菌剂作为控制脉孢霉菌的有效药剂进行进一步的研究或应用。在含有微生物重茬防腐病壮根剂的被抑制菌落边缘大量产孢甚至多于对照组中产孢数量,因为生物在不适合生长的条件下一种加速繁衍的应急现象。对脉孢霉孢子萌发的最大抑制率分别达到64.07%,相对而言,多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉孢子萌发的抑制效果较高。

在对青霉的抑制试验中,微生物重茬防腐病壮根剂对青霉菌丝具有明显的抑制作用,培养4 d的试验平板中青霉菌丝较对照相比半径小很多,所产生的孢子数量也相对少,4 d过后,平板中青霉菌落半径虽不再延长,但仍会产生大量青霉菌孢子,即微生物重茬防腐病壮根剂对青霉菌丝有拮抗作用,对青霉菌孢子的产生起延缓作用。在孢子萌发试验中也证实了微生物重茬防腐病壮根剂对孢子的抑制率较低,为40.16%。而且在观察12 h后,含微生物重茬防腐病壮根剂的孢子悬浮液与对照相似,之前被抑制萌发的孢子重新萌发,生成菌丝状,有的甚至形成孢子聚集的孢子团,说明微生物重茬防腐病壮根剂延缓了青霉菌孢子萌发的时间,而且时间也较短,并不能完全抑制其萌发。多粘类芽孢杆菌对青霉菌丝具有很小的抑制作用,培养4 d的试验平板青霉菌丝较对照相比无明显差异,抑制率为21.08%,但菌落颜色较浅即抑制了青霉菌孢子的产生,孢子萌发试验结果证实了这点,其抑制率最高达到65.04%。多粘类芽孢杆菌对青霉菌孢子萌发具有明显的抑制作用,不仅在培养12 h内的萌发个数很少,而且在培养12 h后仍保持现状,说明多粘类芽孢杆菌对青霉菌孢子萌发有较好的抑制作用,并在一定时间内仍具有一定的抑制作用。

综上,多粘类芽孢杆菌菌剂对脉孢霉和青霉的孢子萌发抑制率较明显,而微生物重茬防腐病壮根剂对两种菌的菌丝生长抑制率较好,在后期的试验应综合使用,能否将两种菌制成合成菌剂使用,同时抑制菌丝生长和孢子萌发。

试验过程中发现脉孢霉的培养虽在恒温培养箱中进行,但其还是会随季节的变化而改变其生长速度,遵循一定的节律。在试验进行的5~9月份其生长速度快于11月份,其中的影响因素仍需继续研究。

参考文献:

- [1] 王晶,李宝聚,孙军德,等.食用菌脉孢霉的发生与防治[J].中国蔬菜,2009(23):16-17.

- [10] 赵晓梅,江英,吴玉鹏,等.果蔬中V<sub>c</sub>含量测定方法的研究[J].食品科学,2006,27(3):197-198.
- [11] 陈秀云,李湘鸣.两种维生素C测定方法的比较[J].现代预防医学,2004,31(3):448-449.
- [12] 王艳颖,姜国斌,胡文忠,等.高效液相色谱法测定草莓中维生素C含量[J].大连大学学报,2006(4):252-253.
- [13] 胡应杰,潘康标,陈昌云,等.高效液相色谱法测定辣椒中维生素C的含量[J].南京晓庄学院学报,2008(11):30-32.
- [14] 张红梅,温中平,田俊学.高效液相色谱法测定沙棘中维生素C的含量[J].国际沙棘研究与开发,2004(9):21-23.
- [15] 阎树刚,韩涛.果蔬及其制品中维生素C测定方法的评价[J].Chinese Agricultural Science Bulletin,2002,18(4):110-112.
- [16] 杜鹏飞,杨国慧.树莓果实维生素C含量测定方法的研究[J].东北农业大学学报,2009,40(2):31-33.

(上接第64页)

- [2] 张学敏,杨集昆,谭琦.食用菌病虫害防治[M].北京:金盾出版社,1994.
- [3] 罗远蝉,张道敬,魏鸿刚,等.多粘类芽孢杆菌农用活性研究进展[A].第四届中国植物细菌病害学术研讨会论文集[C].杭州,2008:59-60.
- [4] 李波,孙思,王翠颖,等.多粘类芽孢杆菌对木麻黄青枯病的抑菌防病作用[J].林业科技开发,2012,26(3):65-67.
- [5] 齐爱勇,赵绪生,刘大群.芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J].中国农学通报,2011,27(12):277-280.
- [6] 孙卉.枯草芽孢杆菌对扩展青霉的抑制特性及其活性物质研究[D].西北农林科技大学,2009.
- [7] 刘雪,穆常青,蒋细良,等.枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用[J].中国生物防治,2006,22(增刊):179-184.

(上接第70页)基因进行基因累加,达到广谱抗病的效果,延缓抗病品种感病化的进程。

参考文献:

- [1] 李杨,王耀雯.水稻稻瘟病菌研究进展[J].广西农业科学,2010,41(8):789-792.
- [2] 雷财林,凌忠专.北方稻区稻瘟病菌生理小种变化与抗病育种策略[J].作物杂志,2000(3):14-16.
- [3] 刘伟.水稻稻瘟病抗性的研究进展[J].中国稻米,2010,16(5):32-35.
- [4] 孙国昌,杜新法.水稻稻瘟病防治研究进展和21世纪初研究设想[J].植物保护,2000(26):33-35.
- [5] 雷财林,张国民.黑龙江省稻瘟病菌生理小种毒力基因分析与抗病育种策略[J].作物学报,2011,37(1):18-27.
- [6] 刘永峰,陈志谊.2001-2010年江苏省稻瘟病菌种群变化分析[J].江苏农业科学,2010,26(6):1233-1237.
- [7] 郭晓莉.吉林省稻瘟病菌生理小种的分布与消长动态[J].吉林农业科学,2009,34(3):33-35.
- [8] 陆凡.江苏省稻瘟病菌生理小种的演变及与水稻品种的相互关系[J].南京农业大学学报,1999,22(4):31-34.
- [9] 全国稻瘟病生理小种联合实验组.我国稻瘟病菌生理小种研究[J].植物病理学报,1980,10(2):71-82.