

## 利用玉米秸秆制备生物杀菌剂的研究\*

田连生 李书生 史延茂 张根伟 黄亚丽

(河北省生物研究所 石家庄 050051)

**摘要** 通过拮抗性筛选分离出对蔬菜枯萎病原菌具有很强抑制作用的木霉菌株“T<sub>41</sub>”,并利用玉米秸秆粉为原料,采用液-固两相发酵工艺制成木霉菌剂。该菌剂对多种蔬菜枯萎病防治效果显著且稳定,并高于化学杀菌剂防治效果。

**关键词** 木霉 拮抗作用 尖镰孢菌

**Study on production of bio-fungicide by using maize stock.** TIAN Lian-Sheng, LI Shu-Sheng, SHI Yan-Mao, ZHANG Gen-Wei, HUANG Ya-Li (Institute of Biology, Hebei, Shijiazhuang 050051, China), *CJEA*, 2005, 13(2): 59~61

**Abstract** ‘T<sub>41</sub>’, a strain of *Trichoderma* sp., is isolated by antagonism selection, which has suppression on the pathogen of vegetable blight. *Trichoderma* sp. agent can be produced with maize stock powder by liquid-solid two-phase fermentation process. The suppression efficiency of ‘T<sub>41</sub>’ on several vegetable blights is high and stable and it is more efficient than that of chemical fungicides.

**Key words** *Trichoderma* sp., Antagonism, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

(Received Dec. 30, 2003; revised Feb. 9, 2004)

化学杀菌剂防治蔬菜病害持续时间短,且其有害物质残留于蔬菜和土壤中,对人体健康和生态环境构成极大危害。拮抗性木霉通过重寄生、抗生、溶菌和生长竞争等一系列拮抗作用能有效抑制尖镰孢菌活动,对多种真菌性土传和叶面病害有明显防治效果,且对作物有明显促生长作用,而对人畜和生态环境无害,同时利用玉米秸秆作原料,有效避免了因焚烧秸秆而造成的环境污染<sup>[1,2]</sup>。

### 1 试验材料与方法

供试菌株为木霉菌剂“T<sub>41</sub>”(以玉米秸秆为原料,采用液-固两相发酵工艺制得)和尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*,由河北省生物研究所微生物研究室自番茄病株上分离),供试材料包括 50% 多菌灵可湿性粉剂(邢台农药二厂产)、DXALUX-20 型光学显微镜、玉米秸秆粉和“毛粉 802”番茄。

木霉菌剂“T<sub>41</sub>”制备试验。以往木霉菌发酵均采用液体深层发酵,得到的分生孢子寿命短,活力弱,活性菌体含量低。而固体发酵生产周期长,活菌剂含量低,生产成本高。本研究采用液-固两相发酵工艺,用玉米秸秆粉为原料,控制适当条件可得孢子含量达 100 亿个/g 的木霉菌剂,具体操作为取玉米秸秆粉 1.0g 装入 250mL 三角瓶中,加水 99mL 高压灭菌后接入木霉“T<sub>41</sub>”菌种,在恒温 28℃ 摇床上转速 180r/min 培养 30h。取秸秆粉 8g 放入 250mL 三角瓶中,将适量培养好的液体发酵液接入固体培养基,搅匀后平放于 30℃ 恒温箱中保持一定湿度进行固体发酵。

拮抗作用测定。制备 PDA 平板,将木霉“T<sub>41</sub>”和尖镰孢菌点接在相对平板边缘,倒置放入恒温培养箱中保持 25℃ 培养,重复 3 次,定期观察并记录菌落生长半径及相互作用情况,同时做木霉“T<sub>41</sub>”和尖镰孢菌纯培养试验并记录满皿时间<sup>[3]</sup>;将木霉“T<sub>41</sub>”和尖镰孢菌接种在 PDA 平板的相对位置并于 25℃ 培养,当 2 菌落接触时置于显微镜下观察菌丝相互作用情况;将接入木霉“T<sub>41</sub>”菌种的液体培养物于 28℃ 下震荡培养 4d,菌液真空抽滤灭菌,滤液放入冰箱备用,用无菌水将尖镰孢菌种洗下,与 PDA 培养基混匀制平板,将牛津小杯置于供试菌平板上,加入上述清液并置于 25℃ 下培养,观察抑菌圈情况,重复 3 次;将木霉“T<sub>41</sub>”和尖镰孢菌对接在 PDA 平板的相对边缘并于 25℃ 培养,连续观察菌落相互影响情况。2 菌落交接处挑取菌丝做涂片,显微镜下观察菌丝交接情况。用麦芽汁 1000mL、苯胺蓝 100mg、琼脂粉 14g 灭菌后制平板,接种“T<sub>41</sub>”菌

\* 河北省博士基金项目资助

收稿日期:2003-12-30 改回日期:2004-02-09

株于 28℃ 培养 3~4d, 观察测定溶菌酶  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性。

室内盆栽试验。室内盆栽(直径 24cm, 装无菌土)番茄种苗 10 株/盆, 木霉菌剂“T<sub>41</sub>”用玉米秸秆粉稀释。设施浓度为 100 万个/g 孢子木霉菌剂“T<sub>41</sub>”2g/株(处理 I); 施浓度为 800 倍液多菌灵 30mL/株, 加玉米秸秆粉 2g/株(处理 II); 施清水 30mL/株, 加玉米秸秆粉 2g/株(对照, CK)共 3 个处理。当番茄苗长出 2~3 复叶时将木霉菌剂“T<sub>41</sub>”按剂量施于秧苗根际, 用无菌土覆盖 2cm, 1d 后接入浓度为 10 万个/mL 病原菌孢子悬浮液 3mL/株, 接种前用小刀破坏根系, 用 800 倍液 50% 多菌灵和清水作对照。每处理 3 次重复, 记录秧苗发病情况。

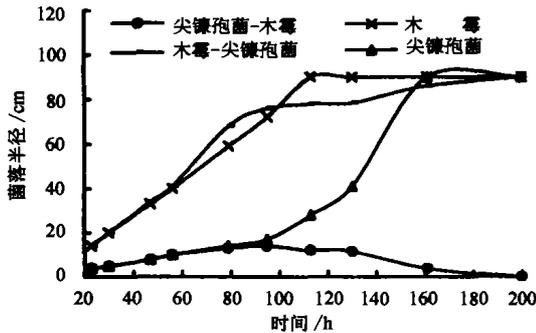


图 1 木霉“T<sub>41</sub>”与尖镰孢菌对峙培养与纯培养菌落生长曲线

Fig.1 The growth curve of dual culture and pure culture of ‘T<sub>41</sub>’ and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

在其内生长, 使尖镰孢菌菌丝变形, 细胞变短, 最后断裂、解体; 拮抗作用, 木霉在生长过程中产生抗生物质, 抑制尖镰孢菌生长和孢子萌发, 使尖镰孢菌菌丝细胞质消解或使菌丝原生质凝结, 并逐渐腐烂失活、解体。“T<sub>41</sub>”发酵液浓度为原液、50g/kg 和 20g/kg 时对尖镰孢的抑菌圈分别为 35cm、34cm 和 12cm, 表明木霉发酵液存在抗生物质, 对尖镰孢菌有明显抑制作用, 且随浓度减少, 抑制作用逐渐降低<sup>[4]</sup>; 竞争作用, 对峙培养发现木霉菌对生存空间和营养资源的竞争作用极强, 可有效抑制尖镰孢菌生长, 使尖镰孢菌菌丝生长混乱、扭曲, 内容物减少并停止生长, 最后被木霉绿色孢子覆盖。显微镜下进一步观察发现尖镰孢菌菌丝和孢子量很少, 多为绿色木霉孢子和正在解体的尖镰孢菌菌丝碎段, 统计结果表明, 木霉“T<sub>41</sub>”和尖镰孢菌的交接面处木霉孢子 > 90%, 尖镰孢菌接种点处木霉孢子量仍 > 82%; 溶菌作用, 尖镰孢菌细胞壁主要成分为几丁质和  $\beta$ -1,3-葡聚糖。水解酶平板活性测定表明, 木霉“T<sub>41</sub>”接种 3d 后菌落直径为 3.6cm, 水解圈直径为 3.4cm。随木霉“T<sub>41</sub>”菌落逐渐覆盖整个平皿, 水解圈直径也逐渐扩大, 4d 后平板蓝色全部消失, 表明木霉“T<sub>41</sub>”在平板培养过程中产生  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶能消解尖镰孢菌细胞壁, 使之发生溶菌作用。

由表 1 可知室内盆栽试验 23d 时对照番茄秧苗已基本枯亡, 最后死亡率等于发病率, 而木霉菌剂“T<sub>41</sub>”处理的秧苗仍健康生长。经统计木霉菌剂“T<sub>41</sub>”对番茄枯萎病的防治效果可达 90%, 优于 800 倍液多菌灵杀菌剂的防治效果。经田间观察木霉菌剂防治番茄枯萎病效果稳定、持久, 处理过的秧苗植株健壮, 株高较多菌灵处理高 14cm, 鲜根物质质量增加 1% 左右, 有一定促生长作用。

### 3 小结与讨论

木霉菌剂“T<sub>41</sub>”主要通过竞争、重寄生和拮抗作用对蔬菜土传性病害进行防治。

## 2 结果与分析

拮抗作用测定。图 1 表明木霉“T<sub>41</sub>”生命力极强, 其纯培养的菌落生长曲线与和尖镰孢菌对峙培养的菌落生长曲线基本相同, 满皿时菌落半径也相差较小, 且 2 菌落生长曲线关联性较好。而纯培养的尖镰孢菌和与木霉“T<sub>41</sub>”对峙培养的菌落生长曲线却相差很大, 2 曲线间基本无关联性, 表明木霉对尖镰孢菌生长有强烈抑制作用, 而其本身受尖镰孢菌生长影响却较小。显微镜观察对峙培养结果发现, 木霉与病原菌交接处形成对峙面, 交界面处尖镰孢菌菌丝被木霉重寄生或利用吸器进入菌丝, 吸取菌丝营养, 逐渐消灭尖镰孢菌气生菌丝, 营养菌丝逐渐失活、解体, 最后被木霉孢子所覆盖。木霉“T<sub>41</sub>”拮抗作用主要包括 4 种方式, 即重寄生, 木霉菌丝以缠绕、穿插、紧贴等方式寄生于尖镰孢菌菌丝上, 通过溶解细胞壁而穿入寄生菌丝并

表 1 木霉菌剂“T<sub>41</sub>”对番茄枯萎病的防治效果

Tab.1 The control efficiency of ‘T<sub>41</sub>’ to tomato blight

处 理 Treatments	重复试验 Repeat treatment	病株数/株 Sum of infected plant	发病率/% Incidence of disease	防治效果/% Control efficiency
I	1	1	10.0	90.0
	2	2	20.0	80.0
	3	0	0.0	100.0
	平均	1.0	10.0	90.0
II	1	3	30.0	70.0
	2	3	30.0	70.0
	3	4	40.0	60.0
	平均	3.3	33.3	66.7
CK	1	10	100.0	-
	2	10	100.0	-
	3	10	100.0	-
	平均	10	100.0	-

木霉生命力较强且对生存空间和营养资源竞争力强,可排斥和抑制尖镰孢菌,通过缠绕、穿透、紧贴等方式木霉菌丝重寄生在尖镰孢菌菌丝上,并通过吸器侵入病菌菌丝体吸取营养,造成病菌菌丝失活、解体。同时木霉在生长过程中还能产生抗生素和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶,消解病菌菌丝细胞质,菌丝断裂溶解直至消失。木霉对尖镰孢菌的拮抗机制及促生长机理尚待进一步深入研究和探索。利用玉米秸秆粉为原料生产的木霉菌剂“T<sub>41</sub>”能长出较多、较长菌丝,可延伸到植株根围较大范围侵染尖镰孢菌,抑制病害发生,不仅提高了木霉防治效果,且可分解秸秆中的纤维素,改善根际原有生态平衡,促进植物生长。同时大量利用废弃玉米秸秆减少了每年因焚烧秸秆对环境造成的污染,是发展高效、绿色、生态农业的理想生物杀菌剂。

### 参 考 文 献

- 1 鲁素芸.植物病害生物防治学.北京:北京农业大学出版社,1993.126~130
- 2 徐 同.木霉对土传病原真菌的拮抗性作用.植物病理学报,1993,23(1):65~67
- 3 赵 蕾.木霉的生物防治作用及其应用.生态农业研究,1997,7(1):66~69
- 4 Papavizas G. C., *et al.* Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology*, 1984, 74(10):1171

## 山东省大力推进生态省建设

自2003年12月山东省全面启动生态省建设以来开局良好,一是该省加强组织领导,形成责任分工明确的组织管理体系。山东省人民政府成立了生态省建设工作领导小组,制定了《山东生态省建设工作领导小组职责和会议制度》、《生态省建设工作领导小组成员单位职责分工》,各成员单位把生态省建设纳入本部门年度重点工作。山东省人民政府与17市人民政府签订了2003~2007年度生态省建设市长目标责任书,17市人民政府均成立了生态市建设工作领导小组,分别与所辖县(市、区)签订了生态市建设县(市、区)长目标责任书,各县也成立了相应组织管理机构,使生态县(市、区)建设各项工作逐项分解,层层落实。二是强化宣传教育,提高全民生态保护意识。由山东省生态省建设宣传教育办公室印发了《关于加强生态省建设宣传教育工作的意见》,分别举办了全省市级领导干部生态省建设研讨班、县(市)领导干部生态省建设培训班,并举办了多场生态建设学术报告会,召开了发展循环经济推进生态省建设座谈会;成功举办了“山东生态省建设高层论坛暨第一届绿色产业国际博览会”,中国、韩国、日本、美国等11个国家和联合国工业发展组织的802个单位参加了会议,为生态省建设打造了宣传教育和交流工作的平台,在全省广大干部群众中深入开展生态文明观和文明发展观教育,把生态省宣传活动纳入精神文明建设整体创建规划,深入开展“绿色学校”、“绿色社区”等创建活动,在全社会形成生态文明之风。三是科学编制规划,绘制生态省(市、县)美好蓝图,编制完成了《山东生态省建设规划纲要》,并通过国家环境保护总局和山东省人民政府组织的省部级专家论证。山东省生态省建设总体目标即经过20年左右的努力,把山东省基本建设成为经济繁荣、人民富裕、环境优美、社会文明的生态省;总指导思想是紧紧围绕建设“大而强、富而美”社会主义新山东和“两个提前”的总目标,抓住环境保护、生态建设、循环经济三大重点和结构调整、水资源优化配置、国土绿化、污染防治4个关键环节,建设以循环经济理念为指导的生态经济体系、可持续利用的资源保障体系、山川秀美的生态环境体系、与自然和谐的人居环境体系、支撑可持续发展的环境安全体系和体现现代文明的生态文化体系。全省17市依据《山东生态省建设规划纲要》编制了生态市建设规划。山东省生态省建设工作领导小组办公室对各生态市建设规划总体要求及原则、规划主要内容、规划编制的组织管理等工作提出指导性意见,并组织高层次专家进行论证,保证了生态市(县)建设规划的编制质量,且实现规划目标的措施做到工程化、具体化、明晰化和时限化,把生态市(县)建设任务落到实处。四是开展创建活动,全面推进生态省(市、县)建设,坚持突出重点、注重实效,抓好典型和示范工程,充分发挥典型示范的引导、带动和辐射作用。2004年山东省章丘市、胶南市等6个国家级生态示范区建设试点先后通过国家环境保护总局验收,全省已有94个县(市、区)成为国家级和省级生态示范区建设试点,有6个获得国家生态示范区命名;有10个城市被授予国家环境保护模范城市称号;考核验收并命名了11个省级环境优美乡镇。同时坚持用循环经济理论指导并规范经济社会活动,初步建立了具有山东省特色的“点、线、面”循环经济试点,烟台经济技术开发区、威海高新技术开发区成为ISO14000国家示范区,全省200家企业实行了清洁生产,烟台经济技术开发区、鲁北化工集团、潍坊海化开发区等开展了生态工业园区建设试点。生态省建设是一项长期而艰巨的任务,也是宏大而复杂的系统工程,扎实的基础是实现这一宏伟目标的先决条件。县作为城市经济与农村经济的结合部,在国民经济和社会发展的全局中处于重要的战略地位,该省在生态省(市、县)建设工作中将遵循自下而上的创建思路,以生态县建设为基础,以抓好生态建设项目为重点,实施可持续发展战略,扎扎实实推进生态省建设。