

复方二氧化氯对平菇褐斑病原菌的杀菌效果及机理

马玉琳¹, 谷娜², 池惠荣³, 王奎涛⁴

(1. 河北科技大学 化学与制药工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 河北科技大学 理学院, 河北 石家庄 050018; 3. 河北省农业科学院 遗传生理研究所, 河北 石家庄 050050; 4. 河北省药用分子化学重点实验室, 河北 石家庄 050018)

摘要:以平菇为试材,将采集到的平菇褐斑病标本进行了细菌菌株的分离纯化,纯化后的细菌菌株经回接感染试验和细菌形态学鉴定确定致病病原菌。通过悬液定量杀菌试验研究不同配方复方二氧化氯食用菌杀菌剂对平菇褐斑病病原菌的杀菌效果,筛选出有效的复方二氧化氯食用菌杀菌剂配方。最后从细菌细胞微观形态和细胞膜渗透性变化2个方面分析了复方二氧化氯的杀菌机理。结果表明:5 mg/L 二氧化氯和 2.3 mg/L 的烷基糖苷的复配后对平菇褐斑病病原菌杀灭对数值可以达到 5,杀菌作用显著。复方二氧化氯中的杀菌增效剂烷基糖苷对二氧化氯杀菌起到协同增效作用,可以降低二氧化氯的用量,复方二氧化氯对病原菌细胞超微结构和内含物的破坏能力大于二氧化氯,杀菌效果更好。

关键词:食用菌;细菌性病害;褐斑病;复方二氧化氯;杀菌

中图分类号:S 436.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0130-05

食用菌病害一直困扰着食用菌行业健康发展。食用菌生长发育所需要的环境条件,同样适合多种病害的生长繁殖,尤其细菌性病害,一旦发生,会造成大量减产,甚至绝产^[1-2]。2011年通过对河北省规模化种植基地的调查显示,平菇、金针菇、鸡腿菇褐斑病普遍存在,严重时损失可达50%以上,被农户称为食用菌癌症,被食用菌界人士称之为国际性难题^[3]。目前市场上虽有一些防治药物,但在治病的同时会形成毒性物质残留,产品无法出口,并造成多起食品安全事件。二氧化氯是一种广谱、高效的杀菌消毒剂,在杀死微生物的过程不产生有害物质,被世界卫生组织(WHO)确认为A1级广

谱、安全、高效消毒剂^[4-7]。在美国和欧盟已被允许用于食品、果蔬等农产品的保鲜和种植过程中的细菌性病害的防治。复方二氧化氯食用菌杀菌剂以二氧化氯为主要成分,添加生物表面活性剂作为杀菌增效剂,减少了药剂使用量,从而降低对食用菌菇体的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种品种为“宝丰19”,取自肥乡县路堡村丰硕食用菌种植有限公司平菇产区菇病。

供试培养基:1)牛肉膏蛋白胨液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,氯化钠 5 g,1 000 mL 蒸馏水中,待其完全溶解后,用10%氢氧化钠溶液调 pH 7.2~7.4,分装,于121℃压力蒸汽灭菌器内灭菌 20 min 后,置于冰箱备用^[8]。2)牛肉膏蛋白胨固体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,氯化钠 5 g,1 000 mL 蒸馏水中,待其完全溶解后,用10%氢氧化钠溶液调 pH 7.2~7.4,加入 15 g 琼脂粉,继续搅拌,加热溶解,分装,于121℃压力蒸汽灭菌器内灭

第一作者简介:马玉琳(1989-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌病害防治。E-mail:804066070@qq.com.

责任作者:王奎涛(1962-),男,教授,研究方向为食用菌病害防治。E-mail:xiaoyuan41@126.com.

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(11230908D-4-4)。

收稿日期:2014-11-11

Abstract: In this paper, ectomycorrhizal fungi of Chinese pine which have been studied over 30 years was summarized, these ectomycorrhizal fungi belonged to two phyla, two sub-phyla, four classes, 10 orders, 20 families, 27 genera, and 43 species have been named among them. The aim of this paper is to better learn the ectomycorrhizal fungal diversity of Chinese pine, and is to provide the basis for the development of efficient ectomycorrhizal fungal inoculums in the future.

Keywords: *Pinus tabulaeformis*; ectomycorrhiza; fungus

菌 20 min 后,备用。

供试试剂:二氧化氯溶液;自制复方型二氧化氯杀菌剂。

检测试剂:考马斯亮蓝 G250,生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 褐斑病菌株的筛选纯化 在超净工作台内,将患褐斑病的平菇用无菌水冲洗 2~3 次,用接种环自褐斑病的平菇菌盖病斑上取样,采用平板划线法进行分离,28℃培养 48 h 得原始混合菌。将得到的混合菌稀释成低浓度的菌悬液,用稀释涂平板和连续划线交替使用的方法,挑取单菌落培养,反复分离纯化,直至无异样菌落出现,得细菌纯培养菌株。

1.2.2 回接感染试验 将已分离纯化的细菌菌株分别置于液体培养基中 28℃培养 48 h,以排列组合的方式配制不同的染菌液,在平菇子实体的菌柄伸出袋口约 3~4 cm 时,用喷雾器每天喷施染菌液 3~4 次,观察褐斑病有无发生。如果褐斑病再次发生,按上面方法重新分离,做镜检观察,确定褐斑病菌株。

1.2.3 悬液定量杀菌试验 参照消毒技术规范^[9],采用悬液定量法进行。试验用菌悬液,浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL。取消毒试验用无菌试管,先加入 0.5 mL 试验用菌悬液,用无菌吸管吸取上述浓度杀菌液 4.5 mL 注入其中,迅速混匀并立即计时 10 min。分别吸取 1.0 mL 样液,在 28℃恒温培养箱中培养,对细菌繁殖体培养 48 h,按活菌培养计数方法测定存活菌数,观察最终结果。试验重复 3 次,计算各组的活菌浓度(CFU/mL),并换算为对数值(N),然后按下式计算杀灭对数值:杀灭对

数值(KL)=对照组平均活菌浓度的对数值(N_0)-试验组活菌浓度对数值(N_x);杀菌率(%)=($1 - 10^{-n}$)×100%;式中:n 为杀灭对数值。

1.2.4 杀菌剂药效试验 在河北某平菇产区菇棚进行复方二氧化氯杀菌剂的现场防治试验,试验选取在试验室药效良好的药剂,以清水为对照进行了菇棚试验。每个处理 10 m×10 m,3 次重复,随机区组排列。于平菇菌棒开袋时开始喷施,喷施前先调查病情指数,喷施后 2 d 再调查病情指数。病情指数(%)=Σ(各级样本数×各级病情级值)/(调查样本总数×最高病情级值)×100%;校正防效(%)=1-[(处理区处理后的病指×对照区处理前病指)/(处理区处理前病指×对照区处理后病指)]。

1.2.5 细菌细胞超微结构表征 将处理后的细菌悬液,经 9 000 r/min 高速离心,弃上清液,沉淀洗涤离心 3 次。采用超薄切片技术制备法制样,在透射电镜下观察并拍照,透射电镜加速电压 80 kV。

1.2.6 细菌细胞膜渗透性试验 细菌细胞膜被破坏后,细胞内蛋白会释放到细菌外部溶液中,因此通过 Bradford 法^[10]测定溶液中可溶蛋白的含量,可以表征细菌细胞膜渗透性的改变。取适量的菌液,分别加入到 5 mg/L 二氧化氯纯溶液和含量相同的复方杀菌剂,作用不同时间,取样测试蛋白含量,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 原菌的确定

对混合菌进行分离、筛选和纯化获得 2 个细菌菌株 A 和 B,如图 1 所示。菌株 A 形成白色圆形菌落,边缘整齐。菌株 B 形成黄色圆形菌落,边缘整齐。

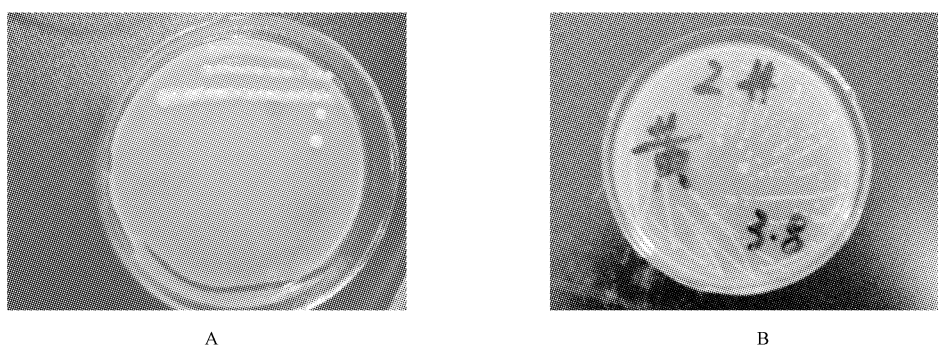


图 1 分离菌种图片

Fig. 1 The photograph of strains

经回接感染试验发现感染 A 菌的平菇菌盖上有黄褐色斑点或斑块,菌盖病变部分凹陷,有粘液^[11]。感染 B 菌的平菇未见异常。初步断定 A 菌为致病菌。对病原菌进行单染色在显微镜下观察,如图 2 所示。A 菌菌体细长,呈球杆状,B 菌菌体呈球状,结合回接感染试验结果从而断定致病菌株为 A^[12]。将所得致病菌株通过

Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定。Biolog 鉴定结果显示 A 为 *Pseudomonas tolaasii* (托拉斯假单胞杆菌)。鉴定结果可能性(PROB)、相似性(SIM)和位距(DIST)分别为 95、0.73 和 3.58。

2.2 悬液定量杀菌试验的结果

2.2.1 单独使用二氧化氯溶液的杀菌效果 由图 3 可

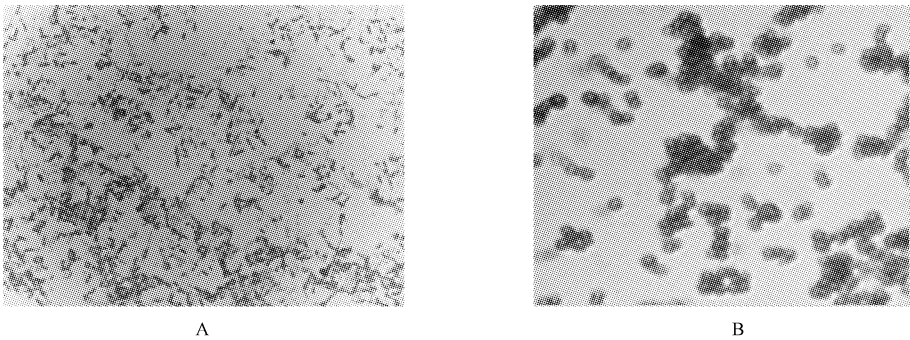


图 2 细菌单染色图片

Fig. 2 The photograph of simple stain

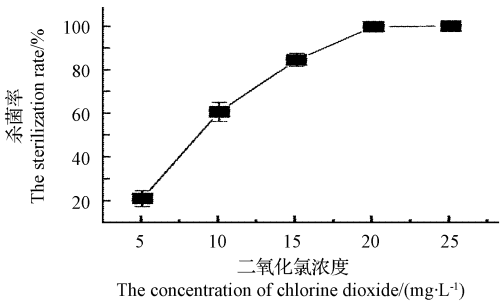


图 3 二氧化氯用量对杀菌效果的影响

Fig. 3 Influence of the dosage of chlorine dioxide on sterilization

知,随着二氧化氯用量的增大,杀菌率也增加。当单独使用二氧化氯量为 25 mg/L 以上时杀菌率可达 100%。

2.2.2 添加表面活性剂后复方型二氧化氯杀菌效果
由表 1 可知,对比单独使用表面活性剂、二氧化氯和两者按一定比例混合使用的杀菌效果好,说明生物表面活性剂和二氧化氯在杀菌方面有协同增效的效果。在原

表 1 不同杀菌剂杀菌效果的对比

Table 1 Comparison of different fungicides affection

杀菌剂 Bactericide	含量 Content		杀灭对数值 The killing log value
	ClO ₂ 溶液 Concentration of chlorine dioxide /(mg·L ⁻¹)	表面活性剂 Content of surfactant /(mg·L ⁻¹)	
ClO ₂ 溶液 Chlorine dioxide	5 10	0 0	0.10±0.002 0.40±0.008
茶皂素 Tea saponin	0	1.2 2.3	0.12±0.002 0.35±0.006
鼠李糖脂 Rhamnolipid	0	1.2 2.3	0.20±0.004 0.38±0.007
烷基糖苷 APG	0	1.2 2.3	1.50±0.03 2.00±0.04
ClO ₂ 溶液+茶皂素 ClO ₂ +tea saponin	5 5	1.2 2.3	1.30±0.02 3.00±0.06
ClO ₂ 溶液+鼠李糖脂 ClO ₂ +rhamnolipid	5 5	1.2 2.3	2.40±0.04 3.60±0.03
ClO ₂ 溶液+烷基糖苷 ClO ₂ +APG	5 5	1.2 2.3	3.70±0.07 4.90±0.09

有配方中加入 3 种表面活性剂后,均可以降低二氧化氯使用量,在二氧化氯用量较低的情况下能获得良好的杀菌效果^[13-14]。其中烷基糖苷的效果最好,5 mg/L 二氧化氯溶液和 2.3 mg/L 的烷基糖苷的复配后杀灭对数值可以达到 5 左右。因此复方二氧化氯配方中应选用烷基糖苷作为杀菌增效剂。

2.3 杀菌剂药效试验

复方二氧化氯杀菌剂的现场防治试验结果如表 2 及用药前后菇体的对比如图 4、5 所示。

由表 2 可以看出,复方二氧化氯杀菌剂防治效果达到 82.88%,防治效果良好。由图 4 可见,感染褐斑病的平菇菌盖上有黄褐色斑点或斑块,菌盖病变部分凹陷。由图 5 可见,用药后平菇菇朵颜色洁白且有弹性。

表 2 杀菌剂药效试验

Table 2 Field trials of compound bactericide

处理 Treatment	药前平均病情指数 Before treatment the average disease index	用药后 2 d 2 days after medication	
		病情指数 Disease index	校正防治效果 Protective effect/%
空白 Blank	10.15	12.63	0
复方二氧化氯 Compound chlorine dioxide (5 mg/L ClO ₂ , 2.3 mg/L APG)	14.18	3.02	82.88



图 4 用药前

Fig. 4 Before treatment



图5 用药后

Fig. 5 After treatment

2.4 杀菌机理

通过细菌细胞超微结构表征和细菌细胞膜渗透性试验,研究了复方二氧化氯杀菌剂协同增效杀菌的机理。

2.4.1 细菌超微结构研究 由图6、7、8可见,分离得到的致病菌A的透射电镜图片及杀菌剂作用后致病菌A的透射电镜图片。发现经过二氧化氯处理后的细菌超微结构有明显的破坏。

由图6可见,正常的致病菌形态完整,结构致密,外缘光滑;由图7可见,二氧化氯作用之后的致病菌的细

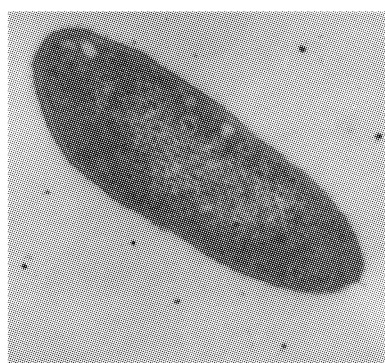


图6 致病菌A图片(20 000×)

Fig. 6 The photograph of bacteria A(20 000×)

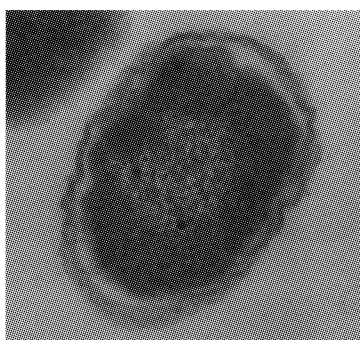


图7 二氧化氯作用后细菌的透射电镜图片(20 000×)

Fig. 7 The TEM photograph of bacteria after chlorine dioxide disposed(20 000×)



图8 复方杀菌剂作用后细菌透射电镜图片(20 000×)

Fig. 8 The TEM photograph of bacteria after compound fungicide disposed(20 000×)

胞壁出现轻微的褶皱,形态完整性受到破坏,细胞内含物出现轻微的凝集现象^[14-15];由图8可见,经复方二氧化氯杀菌剂作用之后的致病菌的微观结构图,它的细胞壁破裂,细胞内含物出现明显的凝集现象。单独使用二氧化氯杀菌时,二氧化氯对细菌细胞膜外部的成分破坏程度较轻,主要靠扩散进入到细胞内部与细胞内部组分发生反应而起到杀菌作用。复方二氧化氯杀菌剂中的加入的生物表面活性剂的疏水链插入细胞膜,改变细胞膜的结构,从而有利于二氧化氯向细胞内部的渗透,进而和细胞内含物反应,提高杀菌率,因而生物表面活性剂对二氧化氯的杀菌有协同增效作用。

2.4.2 细菌细胞膜渗透性试验结果 从图9可以看出,细菌经二氧化氯和复方二氧化氯作用后上清液中可溶性蛋白质含量增加。复方二氧化氯作用后的蛋白质渗漏量明显大于单独使用二氧化氯,说明复方二氧化氯杀菌剂对细胞结构破坏程度大于单独使用二氧化氯,所以复方二氧化氯的杀菌效果优于单独二氧化氯。

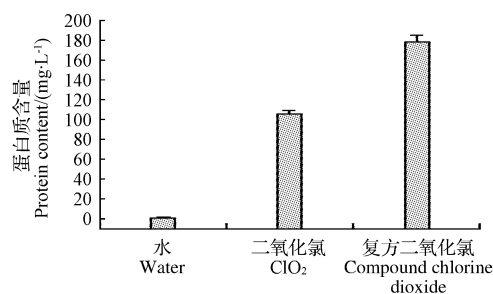


图9 蛋白质含量

Fig. 9 Protein content

3 结论

分离纯化得到平菇褐斑病的细菌菌株,通过回接感染试验和形态学确定致病菌株,致病菌为短杆状的细菌。5 mg/L 二氧化氯溶液和 2.3 mg/L 的烷基糖苷的复配后得到的复方二氧化氯对平菇褐斑病病原菌杀灭对数值可以达到 5。复方二氧化氯配方中的杀菌增效

剂对二氧化氯杀菌起到协同增效作用,可以降低二氧化氯的用量,从而减少对菇体的影响。复方二氧化氯的对细菌细胞结构和细胞内含物的破坏程度大于单独使用二氧化氯,杀菌效果增加。在实际应用中,表面活性剂还可通过降低表面张力的作用,增加复方二氧化氯杀菌剂喷施液在食用菌表面展着力,有利于杀菌剂与食用菌的接触和黏附,杀菌效果远远优于普通的二氧化氯溶液。但是表面活性剂如何促进二氧化氯破坏细胞膜还需要进一步的研究。二氧化氯已经广泛范应用于细菌性病害的防治,如何降低二氧化氯的使用浓度将会成为研究方向之一。

参考文献

- [1] 徐晖. 加快建设我国食用菌市场体系的建议[J]. 新农业, 2011(8): 4-5.
- [2] 黄军平. 平菇褐斑病品种抗病性鉴定及防治药剂筛选[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [3] 覃宝山, 覃勇荣. 二氧化氯在食用菌栽培中的应用研究进展[J]. 北方园艺, 2012(16): 201-204.
- [4] 郑志军, 王奎涛, 张炳炅, 等. 二氧化氯在消毒方面的应用[J]. 中国氯碱, 2009(5): 25-26.
- [5] Ni Y, Wang X. Mechanism and kinetics of chlorine dioxide reaction with hydrogen peroxide under acidic conditions[J]. Can J Chem Eng, 1996, 75: 31-36.
- [6] Cho Y S, Kim J S, Crowley D E, et al. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(2): 271-276.
- [7] 陈循军, 崔英德, 郭彪. 二氧化氯的性质、制备及应用[J]. 广州化工, 2002(2): 11-15.
- [8] 刘建军, 金力, 朱爱莲, 等. 食用菌工厂化生产培养料制备技术的研究[J]. 食用菌, 2009(6): 30-32.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002: 124-126.
- [10] Bradford M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248.
- [11] 石延霞, 金丹, 孟姗姗, 等. 托拉斯假单胞杆菌弱毒菌株诱导平菇抗细菌性褐斑病的研究[J]. 园艺学报, 2014(2): 293-300.
- [12] 金丹, 李宝聚, 石延霞, 等. 一种平菇褐斑病原菌的鉴定[J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 89-91.
- [13] 张文福. 表面活性剂在消毒领域中的应用[J]. 日用化学工业, 2004(2): 108-110.
- [14] 高金龙, 牛佳静, 谷娜, 等. 一种复方二氧化氯消毒剂杀菌效果及其杀菌机理的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2014(6): 565-567.
- [15] Gea F J, Tell J C, Navarr M J. Efficacy and effects on yield of different fungicides for control disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosa*[J]. Crop Prot, 2010, 29: 1021-1025.

The Germicidal Efficacy and Mechanism of a Compound Chlorine Dioxide to Pathogen of Oyster Mushroom Brown Spot

MA Yu-lin¹, GU Na², CHI Hui-rong³, WANG Kui-tao⁴

(1. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018; 2. School of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018; 3. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agricultural Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050050; 4. Key Laboratory of Medicinal Molecular Chemistry in Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract: Taking oyster mushroom as test material, the bacteria strains were isolated from oyster mushroom infected by brown spot and pathogenic bacteria were indentified by artificial infection test and morphological identification. The optimum ingredient design of compound chlorine dioxide was determined by studying the bactericidal effects of bactericide with different ingredients on pathogenic bacteria of brown spot through using suspension quantitative germicidal test. At last the germicidal mechanism of compound chlorine dioxide was analyzed by the variation of micro morphology of bacterial cell determined by TEM and permeability of cell membrane indicated by soluble protein. The results showed that the killing log value of pathogen of oyster mushroom brown spot exposed to optimum compound ingredient with 5 mg/L chlorine dioxide disinfectant and 2.3 mg/L alkyl-polyglucoside (APG) could attain 5. The use of sterilization synergist APG in compound chlorine dioxide could decrease the dosage of chlorine dioxide thus reduce the affection to fruitbody. The damaged capacity of compound chlorine dioxide to micromorphology and inclusion of bacteria cells was more than chlorine dioxide.

Keywords: edible mushroom; bacterial disease; brown spot; compound chlorine dioxide; sterilization