

# 死谷芽孢杆菌对香菇栽培料中木霉菌的抑制研究

郝捷<sup>1</sup> 李杨<sup>2</sup> 陈飞<sup>2</sup> 王萍<sup>1</sup> 李莉<sup>2\*</sup>

(1. 沈阳农业大学 辽宁 沈阳 110866)

(2. 辽宁省微生物科学研究院 辽宁 朝阳 122000)

**摘要:** 【目的】木霉是食用菌生产过程中侵染率较高的杂菌, 通常使用化学药剂消杀, 但这会带来农药残留问题, 利用死谷芽孢杆菌防治木霉展开研究。【方法】首先确定死谷芽孢杆菌抑制木霉的成分是胞内还是胞外物质; 其次有效物质经过提取, 分析其理化性质的稳定性; 最后研究在香菇栽培料中的初步应用效果。【结果】提取的死谷芽孢杆菌胞外分泌物属于脂肽类, 能有效抑制木霉孢子萌发和菌丝生长, 0.02 g/L 即可达到 62.8% 的抑菌率, 对香菇菌丝生长影响较小, 且理化性质比较稳定。香菇栽培料中添加 26.6% 的 36 h 死谷芽孢杆菌发酵液, 对木霉菌丝抑制程度最高, 防治效果较理想。【结论】死谷芽孢杆菌产生的胞外分泌物对木霉有良好的抑制作用, 虽然对香菇的菌丝萌发也有一定的抑制作用, 但从减少农药残留问题考虑, 值得进一步研究。

**关键词:** 死谷芽孢杆菌, 木霉, 脂肽, 生物防治

## Inhibitory of *Bacillus vallismortis* to *Trichoderma* parasitized in *Lentinus edodes*

HAO Jie<sup>1</sup> LI Yang<sup>2</sup> CHEN Fei<sup>2</sup> WANG Ping<sup>1</sup> LI Li<sup>2\*</sup>

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

(2. Liaoning Scientific Research Academy of Microbiology, Chaoyang, Liaoning 122000, China)

**Abstract: [Objective]** The inhibition of *Bacillus vallismortis* to *Trichoderma* was researched in this article, because *Trichoderma* was a harmful bacterial with a higher infection rate in the

\*通讯作者: ✉: lili@lnnsw.com.cn

收稿日期: 2012-04-13; 接受日期: 2012-06-29

mushroom production and was normally killed by chemical agent with the result of pesticide residues. **[Methods]** Firstly, the components of *Bacillus vallismortis* were confirmed if they were the intracellular or extracellular materials. Then the stability of the physical and chemical properties of the effective component was analyzed after extraction. Finally, initial application in the mushroom cultivation was probed. **[Results]** The lipopeptide extracted from exocellular secretion of *Bacillus vallismortis* can effectively inhibit the germination of spores and mycelial growth. The inhibition rate could reached 62.8% with 0.02 g/L, little influence on the growth of mushroom mycelium, relatively stable physical and chemical properties. An addition of 26.6% 36 h fermentation broth of *Bacillus vallismortis* in the mushroom cultivation compound had the optimum inhibition on *Trichoderma* hyphae. **[Conclusion]** Extracellular secretions of *Bacillus vallismortis* had good inhibition on *Trichoderma*. It was worth further investigating considering the reduction of pesticide residues, though the mushroom mycelium germination was also inhibited at a certain degree.

**Keywords:** *Bacillus vallismortis*, *Trichoderma*, Lipopeptide, Biocontrol

食用菌生产应用中,从制种、发菌、出菇各个阶段都会出现杂菌的侵染,如香菇(*Lentinus edodes*)受木霉(*Trichoderma* sp.)侵染后菌柄和菌盖变褐腐烂,后期感染的子实体逐渐腐烂,且整个菌棒也会霉变腐烂<sup>[1]</sup>。木霉具有很强的腐生竞争能力,与香菇接触共同培养时发现,两菌丝互相缠绕,与香菇竞争养分,导致香菇菌丝出现枯萎、溶解,不能正常生长。吴小平等<sup>[2]</sup>对食用菌栽培过程中相关木霉菌种做了形态学和 ITS 鉴定,发现侵染食用菌栽培料中哈茨木霉(*T. harzianum*)和长枝木霉(*T. longibrachiatum*)出现频率最高。为了减少杂菌的侵染,农业上化学药剂多使用甲醛溶液、多菌灵、克霉灵、百菌清等进行杀灭。长久施用化学药剂,使得杂菌产生了耐药性,甚至突变株,田连生等<sup>[3]</sup>在耐药性木霉菌株的诱变选育过程中,得到一株能矿化多菌灵的变异菌株 T32,具有很强的耐药性。化学药剂虽然可以杀灭食用菌生产过程中侵染的部分杂菌,但是农药残留一直是影响食用菌品质的重要问题。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是人类发现最早的细菌之一,分布广泛,其抑制病原菌的范围很广、

抗性强、无毒副作用,在动植物的生物防治中,应用比较广泛。芽孢杆菌可产生肽类、脂肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类、核酸类等抗菌物质<sup>[4]</sup>,不同种类的抗菌物质有不同的生物学活性,因此芽孢杆菌所分泌的胞外抗菌物质能抑制真菌、细菌、病毒等多种致病因子<sup>[5-7]</sup>。芽孢杆菌作为生防菌的研究,多数应用集中于防治动植物病原菌引起的病害,并有大量的报道。而死谷芽孢杆菌,经过鉴定,与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)类似,可以对链球菌(*Streptococcus mutans*)产生抑制作用<sup>[8]</sup>。微生物制剂在食用菌栽培中的成功应用目前还很少,生物防治尚处于起步阶段,为此,本文针对香菇生产栽培过程中出现的木霉菌,进行了生物防治方面的相关研究,将有助于降低食用菌生料栽培出现的杂菌侵染。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及培养基

菌株 B10: 死谷芽孢杆菌 *Bacillus vallismortis*<sup>[9]</sup>。

木霉(*Trichoderma* sp.) 29、74 (保藏中心编号 3.3029, 3.2774), 香菇(*Lentinus edodes*) P18, 辽宁

省微生物科学研究院菌种保藏中心提供。

培养基<sup>[9]</sup>: NA 培养基, LB 培养基, PDA 培养基。

香菇栽培料: 木屑 78%, 麸皮 20%, 石膏 1%, 糖 1%。180 mm 试管中装入栽培料干料 6 g, 水 5 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 2 h。

## 1.2 脂肽的提取

菌株 B10 在 NA 斜面上活化 24 h 后, 于 100 mL LB 液体培养基中培养, 170 r/min、 $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  培养 24 h 作为种子液, 吸取 5 mL 于 95 mL LB 培养基中再振荡培养 36 h 得到 B10 的发酵液。

参照文献[10]的方法, 略作改动, 将 36 h 发酵液装入 50 mL 离心管,  $4^\circ\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜得到发酵上清液。用 6 mol/L 盐酸调 pH 至 2.0,  $4^\circ\text{C}$  过夜。 $4^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀调 pH 至 7.0, 80% 甲醇抽提 2 次,  $40^\circ\text{C}$  真空干燥, 得红棕色固体即为脂肽粗提物。用无菌水或 80% 甲醇重新溶解, 配置成 0.1 g/L 准备待用。

## 1.3 脂肽对木霉抑制试验

将平板培养的木霉用 8 mm 打孔器打孔制成菌碟, 接入新的 PDA 培养基平板一侧, 另一侧加入牛津杯, 相距 30 mm, 加入 200  $\mu\text{L}$  脂肽粗提物溶液, 以无菌水和 80% 甲醇溶液为对照, 3 次重复。 $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  培养 48 h, 测量抑菌圈大小。

抑菌带宽按照下式计算:

抑菌带宽=

$$\frac{\text{抑菌圈最大直径} + \text{抑菌圈最小直径}}{2} - 8$$

式中, 8 为牛津杯的外径(单位 mm)。

脂肽粗提物用无菌水配制成 0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0 g/L, 用滤纸片法, 蘸取溶液, 放入 PDA 培养基中, 接入木霉于 PDA 培养基中间, 每处理 3 次重复,  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  培养 48 h 后观察

抑菌圈, 计算最小抑制浓度。

## 1.4 脂肽对木霉孢子萌发影响

将 50  $\mu\text{L}$  脂肽粗提物水溶液与 100  $\mu\text{L}$  PDA 液体培养基混匀, 加入表面皿, 以加入 50  $\mu\text{L}$  无菌水为对照, 用 1 mL 无菌水洗下木霉的孢子, 制成悬液, 调整浓度为  $6 \times 10^7$  CFU/mL, 向表面皿内加入 50  $\mu\text{L}$ , 每个处理 3 次重复, 置于  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  恒温培养 8 h 后, 每 4 h 镜检一次, 计算孢子萌发率。

## 1.5 脂肽稳定性研究

**1.5.1 温度:** 脂肽粗提物水溶液经  $20^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$ 、 $80^\circ\text{C}$ 、 $100^\circ\text{C}$  和  $121^\circ\text{C}$  分别处理 10 min 后, 用滤纸片法, 蘸取处理过的溶液, 放入 PDA 培养基中, 接入木霉于 PDA 培养基中, 每处理 3 次重复,  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  培养 48 h 后观察抑菌活性。

**1.5.2 pH 值:** 脂肽粗提物加入少量蒸馏水溶解, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调 pH 值为: 4、5、6、7、8、9、10, 处理 24 h, 然后回调至原水平; 取 20  $\mu\text{L}$  于 5 mm 的无菌滤纸片上, 接入木霉的 PDA 培养基中, 每处理 3 次重复,  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  培养 48 h 后观察抑菌活性。

**1.5.3 紫外线:** 取 100  $\mu\text{L}$  脂肽粗提物水溶液 4 份, 直接暴露于紫外灯下, 距离 100 mm, 时间分别为 0、0.5、1、2、4 min, 每处理 3 次重复, 然后观察其抑菌活性。

## 1.6 菌株 B10 在香菇栽培料中的应用初探

菌株 B10 经过 36 h 的培养, 发酵液中细菌菌群含量平均为  $7.2 \times 10^8$  CFU/mL, 得到的发酵液以 0.5、1、2、3、4 mL 5 个梯度分别加入到两组灭菌好的试管中(标记为 F0.5、F1、F2、F3、F4)见表 1, 最后用无菌水补足至 9 mL, 以加无菌水的试管为对照。A 组在试管口接入木霉, B 组在试管口接入香菇, 每组 3 次重复, 分别观察发酵液在栽培料中对木霉菌丝生长影响和对香菇菌丝影响情况。

36 h 发酵液去除 B10 菌体, 得到的上清液浓缩至 1/10 体积, 以 0.5、1、2、3、4 mL 5 个梯度

表 1 栽培料中菌剂添加方法							
Tabel 1 The method of strains agent addition in cultivation material							
组别	发酵液、上清液浓度梯度						菌种
Group	Fermented broth and the culture supernatant on the concentration gradient						Strain
A	CK	F0.5	F1	F2	F3	F4	<i>Trichoderma</i> 29
B	CK	F0.5	F1	F2	F3	F4	P18
C		W0.5	W1	W2	W3	W4	<i>Trichoderma</i> 29
D		W0.5	W1	W2	W3	W4	P18

注: CK: 无菌水; F: 发酵液; W: 发酵上清液.  
Note: CK: Sterile water; F: Fermentation broth; W: Culture supernatant.

分别加入到两组灭菌好的试管中(标记为 W0.5、W1、W2、W3、W4), 最后用无菌水补足至 9 mL, 以只加无菌水的试管为对照.C 组在试管口接入木霉, D 组在试管口接入香菇, 每组 3 次重复, 分别观察上清液在栽培料中对木霉菌丝生长影响和对香菇菌丝影响情况。木霉和香菇各组分别以最快长满试管的为止, 测量各组菌丝生长长度。

2 结果与分析

2.1 脂肽对木霉抑制试验

如图 1 所示, 以无菌水、80%甲醇为对照组, 对木霉没有呈现明显的抑菌圈, 木霉可以紧贴牛津杯生长。而脂肽粗提物对木霉有明显抑制现象,

对木霉 29、74 的抑制带宽分别达到 21.79 mm、20.49 mm。

从 36 h 发酵液中提取出来的脂肽粗提物, 经过多次重复提取, 平均每 1 000 mL 发酵液可以提取 2.5 g, 与王帅等<sup>[1]</sup>报道的最高产量 3.5 g/L 相近。本试验以 0.1 g/L 脂肽粗提物溶液为阳性对照, 结果见图 2, 随着浓度的降低, 活性也在逐渐降低, 0.02 g/L 的活性已降至 0.1 g/L 的 62.8%, 0.01 g/L 的滤纸片和阴性对照则被木霉完全覆盖生长。初步确定从菌株 B10 提取的脂肽粗提物对木霉的最低抑制浓度为 0.02 g/L。

2.2 脂肽对木霉孢子萌发影响

木霉 29、74 孢子与 PDA 液体培养基混合后, 26 ℃ 培养, 没有加脂肽粗提物的对照组培养 8 h

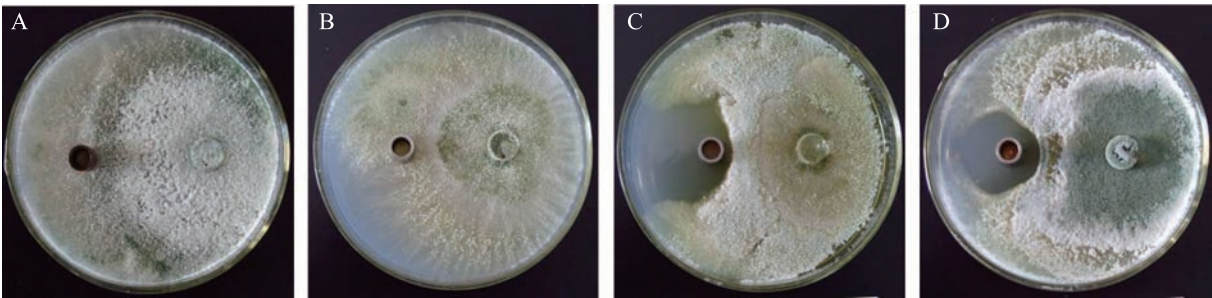


图 1 脂肽粗提物对木霉的抑制效果

Fig. 1 Inhibition of lipopeptide extracts to *Trichoderma*

注: A: 无菌水对照; B: 80%甲醇对照; C: 脂肽与木霉 29; D: 脂肽与木霉 74.

Note: A: By sterile water compared; B: By 80% methanol compared; C: Lipopeptide extracts to *Trichoderma* 29; D: Lipopeptide extracts to *Trichoderma* 74.

镜检,个别孢子出现萌芽管,此时用细胞计数板计算孢子萌发率,之后每隔 4 h 观察一次,统计数据见图 3,随着时间的推移,对照组的孢子萌发个数逐渐增多,24 h 镜检发现几乎全部萌发,形成有大量的菌丝体,而且肉眼可见培养基中的菌丝团。

脂肽粗提物混合的培养基,木霉 29、74 均不能正常生长,孢子萌发率很低,培养 16 h 镜检观察,只有个别孢子出现萌芽管,约 8%的萌发率,培养 24 h 观察到已萌发孢子菌丝体短小,其他孢子则没有萌发迹象。

### 2.3 稳定性

脂肽经重新溶解,温度和紫外线影响结果见

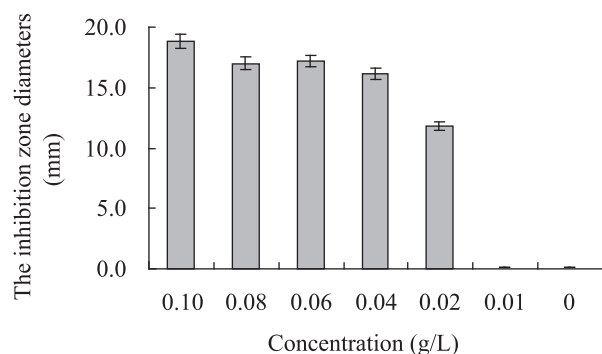


图 2 不同浓度脂肽活性统计

Fig. 2 Active statistics of lipopeptide with different concentrations

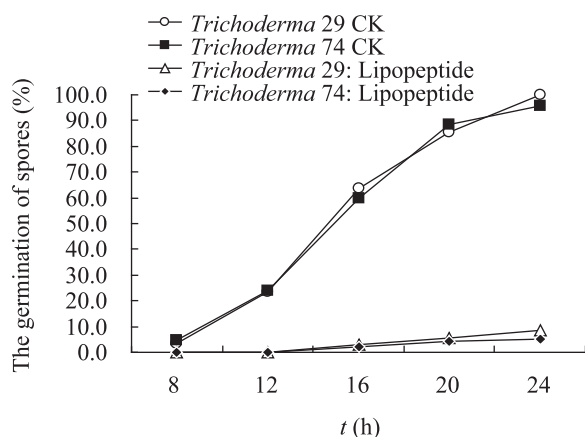


图 3 脂肽粗提物对木霉孢子萌发的影响

Fig. 3 The effect of lipopeptide extract on the germination of spores

图 4。通过 6 个温度梯度处理,以 20 °C 条件为对照,40 °C、60 °C、80 °C、100 °C、121 °C 抑菌圈大小分别为 19.1 mm、19.6 mm、18.9 mm、17.7 mm、0 mm。当温度达到 100 °C 时,活性较室温下减弱,但抑制活性是 20 °C 的 82.3%。然而 121 °C 处理后,活性则丧失,对木霉没有抑制活性,培养皿中木霉可以正常生长,没有出现抑菌圈。

浓度为 0.1 g/L 的脂肽粗提物溶液距离紫外灯 100 mm 处理,经过 0、0.5、1、2、4 min 照射,各时间段都出现抑菌圈,分别为 21.5 mm、17.3 mm、18.1 mm、17.9 mm、17.8 mm,依然保持较高抑菌活性,所以紫外线对活性物质的影响较小。

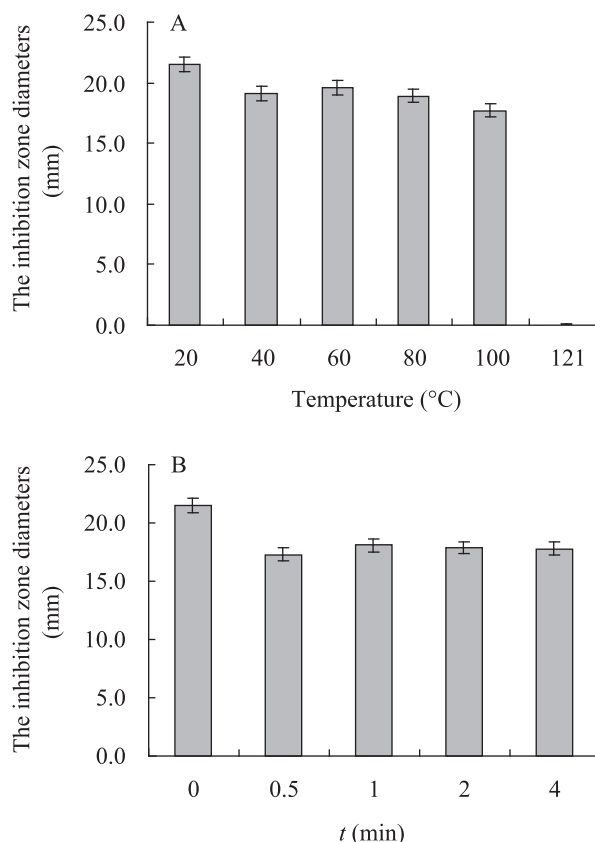


图 4 脂肽经不同温度(A)和不同时间(B)紫外线处理活性统计

Fig. 4 Active statistics of lipopeptide at different temperatures (A) and different time of UV treatment (B)

脂肽粗提物水溶液经调节 pH 处理后, 与木霉同培养, 均出现抑菌圈, 各梯度均有抑菌活性。所以酸碱度对脂肽粗提物活性几乎没有影响。

2.4 栽培料中应用结果分析

分别添加发酵液和发酵上清液的栽培料中, C组接入木霉的 W1, 第 13 天长满整只试管, 此时测量其他试管中木霉侵染栽培料的长度。接种香菇的 CK 经过 21 d 长满整只试管, 此时测量其他试管中香菇在栽培料的生长长度。以各组 CK 的

抑菌率为 0, 计算得到各浓度梯度抑制率见图 5。

结果显示, A 组随着发酵液添加量的增加, 对木霉的抑制程度越来越大, 由于栽培料中菌株 B10 的存在, 可以不断的产生脂肽物质, 所以抑制现象明显。而 C 组 W0.5 和 W1 的木霉比对照组生长快, 呈现一种促进生长的现象, 促进率为 11%, 只有 W4 对木霉有较小的抑制作用, 这可能与脂肽物质在木霉生长的 13 d 里被降解, 或者是由于上清液浓缩过程中, 只是减少了含水量,

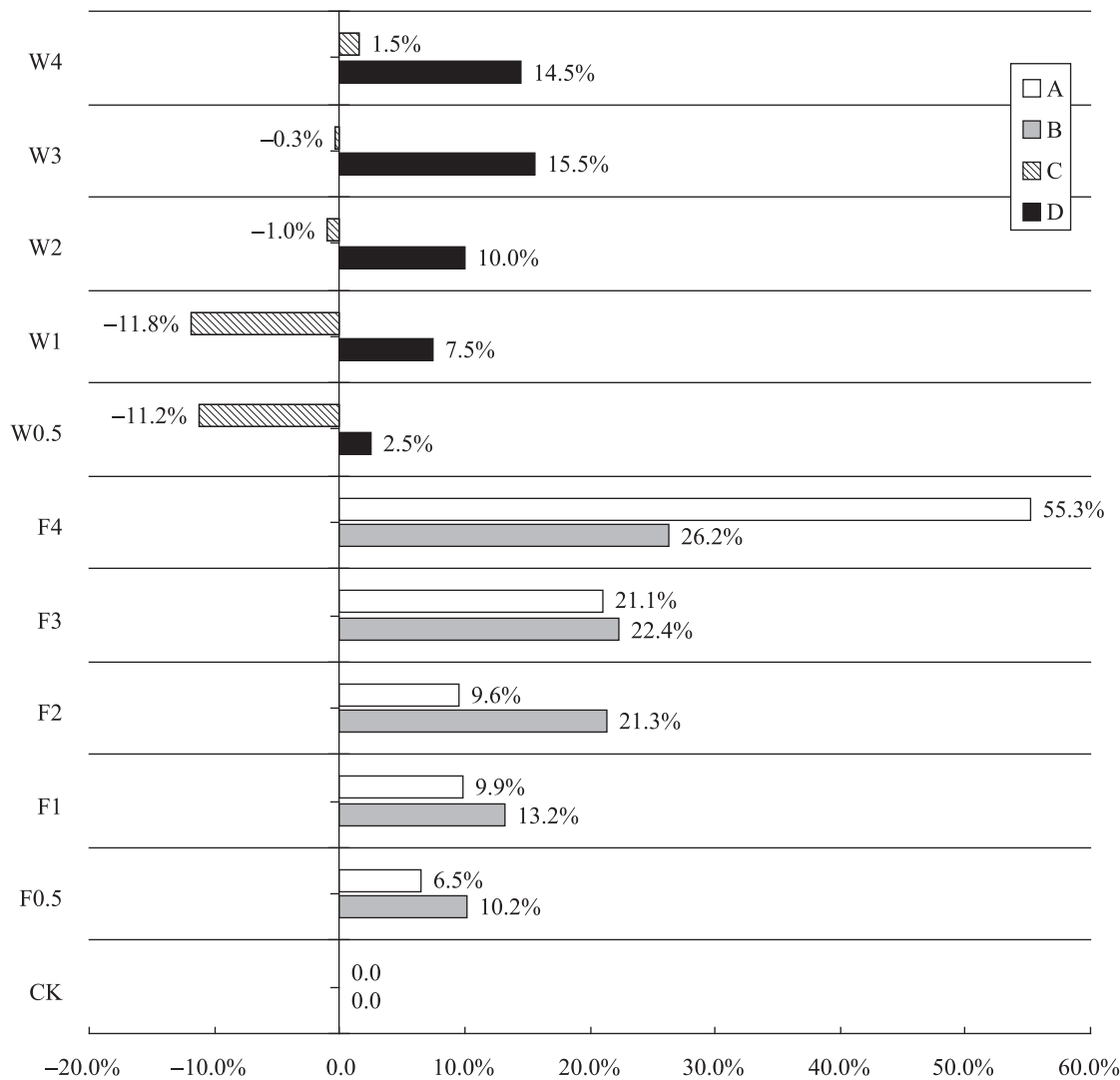


图 5 发酵液和发酵上清液分别对木霉和香菇的抑制率  
Fig. 5 The inhibition of adding the supernatant or culture broth of B10 on *Lentinus edodes* and *Trichoderma* respectively

但上清液中依然含有适合微生物生长的碳源和氮源,这也增加了栽培料中的营养成分,由于没有细菌的存在,这部分养分完全留给了木霉利用,从而产生了促进木霉生长的现象。

B组发酵液和D组上清液对香菇的抑制也呈梯度影响,这是由于香菇与木霉都属于真菌,生长容易受外界条件影响,而B10所产生的脂肽物质对真菌都会有一定程度的影响。但从实验数据来分析,菌株B10所产生脂肽粗提物,对香菇产生的影响较小,在适宜条件下培养的香菇,试管中生长的最短长度为101.1 mm,并且香菇生长较木霉缓慢,栽培料的成分又不适宜细菌的生长,所产生的胞外物质随着时间推移,浓度会降低,在应用中有利于食用菌生物防治。

通过计算分析,添加3 mL的发酵液对木霉和香菇的抑制均在21%,与其他梯度相比较差异最小;添加4 mL的发酵液对木霉抑制程度最大,抑菌率为55.3%,对香菇抑制率仅为26.2%,比较适合作为应用的添加量,其添加量占栽培料总量的26.6%。

### 3 讨论

食用菌生产过程中,杂菌的防治一直是难题,从本文的研究结果来看,死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*) B10对食用菌的侵染菌木霉有较强的抑制作用,其抑制机理是来自菌株B10胞外分泌的脂肽类物质,该物质的粗提成分可能包含水解酶类<sup>[12-13]</sup>、伊枯草菌素等抗菌肽<sup>[14-16]</sup>。理化性质的实验说明温度、紫外、酸碱度对B10脂肽粗提物影响较低,0.02 g/L的粗提物对木霉即可产生62.8%以上抑制效果,从理论上奠定了食用菌生物防治应用的基础。

实际生产过程中,木霉的侵染主要来源于栽培料灭菌的不彻底,木霉的萌发多数由于存在木霉孢子,且木霉的生长速度较香菇快,木霉如果

大量繁殖,就会影响香菇对栽培料的利用率。实验表明起抑制作用的是菌株B10的胞外分泌物,在初探研究中,为了降低提取粗提物的成本和产品的简易使用,所以选择直接利用菌株B10发酵液进行试验。虽然发酵液对香菇的生长有一定的影响,从试管栽培试验结果分析,发酵液中的B10菌体在栽培料中能够定殖,接入木霉或者香菇后,一定程度上还在繁殖,然而栽培料配方不适合菌株B10大量生长,不能与木霉、香菇形成长期内的竞争关系,而细菌前期生长过程继续产生脂肽类物质,对木霉的抑制程度较为明显。只要菌株B10添加合适的量,如本文研究结果中,36 h发酵液占栽培料中水分的44.4%,占栽培料总重的26.6%,即可在前期抑制木霉孢子的萌发及菌丝的生长,待香菇菌丝复壮、发菌、开始吃料,保持较高生长能力时,B10产生的脂肽类抑菌物质对香菇的抑制效果会逐渐减弱,这样即可有效地抑制木霉,也会降低对香菇产量的影响,从而达到生物防治的效果,对食用菌的生料栽培具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] 吴晓金,詹友学,吴小平. 木霉对食用菌侵染能力的分析[J]. 福建农业学报, 2007, 22(4): 354-359.
- [2] 吴小平,吴晓金,胡方平,等. 食用菌栽培中相关木霉的遗传多样性及生物学特性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 37(5): 527-531.
- [3] 田连生,陈菲. 木霉对多菌灵的生物降解特性研究[J]. 土壤学报, 2009, 46(6): 1127-1130.
- [4] Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, et al. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish [J]. Aquaculture, 1998, 165(3/4): 269-280.
- [5] 曹春娜,石延霞,李宝聚. 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病药效试验[J]. 中国蔬菜,

- 2009(14): 53–56.
- [6] 陈莉, 檀根甲, 丁克坚. 枯草芽孢杆菌对几种灰霉菌的抑制效果研究[J]. 菌物研究, 2004, 2(4): 44–47.
- [7] 邓建良, 刘红彦, 王鹏涛, 等. 生防芽孢杆菌脂肽抗生素研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 20–24.
- [8] Kim JB, Jung WH, Ryu JM, et al. Identification of a fibrinolytic enzyme by *Bacillus vallismortis* and its potential as a bacteriolytic enzyme against *Streptococcus mutans*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 605–610.
- [9] 郝捷, 李莉, 陈飞, 等. 菌株 B10对食用菌木霉病的拮抗作用及菌株鉴定[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(4): 42–46.
- [10] Chen H, Wang L, Su CX, et al. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology, 2008, 47(3): 180–186.
- [11] 王帅, 高圣风, 高学文, 等. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件[J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 342–347.
- [12] 崔云龙, 姬金红, 衣海青. 短小芽孢杆菌 D82对小麦根腐病原菌拮抗的研究[J]. 中国生物防治, 1995, 11(3): 114–118.
- [13] 谢栋, 彭憬, 王津红, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98III 的纯化和性质[J]. 微生物学报, 1998, 38(1): 13–19.
- [14] 刘颖, 徐庆, 陈章良, 等. 抗真菌肽 LP-1的分离纯化及特性分析[J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 441–447.
- [15] 黎起秦, 林纬, 陈永宁, 等. 芽孢杆菌对水稻纹枯病的防治效果[J]. 中国生物防治, 2000, 16(4): 160–162.
- [16] Marsh J, Goode JA. Antimicrobial peptides (Ciba Foundation Symposium 186)[M]. New York: John Wiley & Sons, 1995.

## 编辑部公告

### 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。