

蜡质芽孢杆菌AT31防治根结线虫的应用技术探讨

刘元兵¹, 舒 畅¹, 高 扬², 夏长松¹, 闫俊会¹, 张雪雪¹

(1.新沂中凯农用化工有限公司, 江苏 新沂 221400;

2.安徽省微生物防治重点实验室/安徽农业大学, 安徽 合肥 230036)

Research on Application Technology of *Bacillus Cereus* AT31 Against Root-knot Nematodes

Liu Yuanbing, Shu Chang, Xia Changsong, Yan Junhui, Zhang Xuexue (Xinyi Zhongkai Agro-Chemical Industry Co., Ltd., Jiangsu Xinyi 221400, China)

Gao Yang (Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control/Anhui Agricultural University, Anhui Hefei 230036, China)

Abstract: In order to instruct the technology using the *Bacillus cereus* AT31 to prevent and control the root knot nematode, the experiment was conducted with different concentration in greenhouse. The result showed the control effect of 15 times dilution reached 55.69%, which is significantly higher than other lower dilutions. The number of thallus and spore content are both on the level of 1.3×10^9 CFU/mL after 48 to 72 hours in *Bacillus cereus* AT31 with secondary fermentation, which reached the level of the a.i. content of the product solution. The optimum dose is 450L/hm² with control effect 66.67%. The result showed, it is an efficient method to control root knot nematode using *Bacillus cereus* AT31 with secondary fermentation with control effect 73.46%, similar to the effect of original solution and Fosthiazate 10% granules.

Key words: root-knot nematode; *bacillus cereus*; secondary fermentation; efficacy trial; control effect

摘 要: 为指导蜡质芽孢杆菌AT31防治根结线虫的田间使用技术, 采用不同剂量进行室内盆栽试验, 15倍液防效达55.69%, 显著高于低剂量防效。蜡质芽孢杆菌AT31产品在使用前进行二次发酵, 48~72h的发酵液中菌体数和芽孢数均在 1.3×10^9 CFU/mL以上, 达到产品原液有效成分含量水平。二次发酵液的不同剂量防治根结线虫盆栽试验显示450L/hm²为田间适宜剂量, 对根结线虫防效为66.67%。大棚田间试验表明蜡质芽孢杆菌AT31产品在田间使用前利用二次发酵的方法可以有效的控制根结线虫病害, 防效达73.46%, 与产品原液及噻唑

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 江苏省科技创新与成果转化(重大成果转化)资金(编号: BA2012059)

作者简介: 刘元兵, 男, 硕士研究生, 主要从事植物病虫害生物防治研究。联系电话: 0516-88969629; E-mail: liuyuanbing208@163.com。

磷10%颗粒剂防效相近。

关键词: 根结线虫; 蜡质芽孢杆菌; 二次发酵; 药效试验; 防治效果

中图分类号: S482.2; S481+.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-5480 (2015)10-52-06

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是一类为害蔬菜瓜果的重要植物病原线虫, 发生严重的田块可引起30%~50%的产量损失, 对瓜果蔬菜的生产和出口创汇威胁很大^[1]。同时根结线虫的危害还常伴随着枯萎病、灰霉病、根腐病等植物土传性病害的发生^[2]。根结线虫的防治主要以化学防治为主, 目前很多蔬农施用高毒化学农药进行防治, 但效果不很理想, 且容易造成环境和农产品的严重污染^[3-4]。采用生物农药防治根结线虫虽然有较多的研究报道^[5], 但市场上推广使用的生物农药种类却较少。因此开发利用高效低毒无公害的生物农药防治根结线虫对蔬菜安全生产十分重要。

芽孢杆菌是细菌型生物农药中重要的一类, 作用机理主要是通过空间位点和营养物质与病原菌竞争, 直接分泌胞外酶起到降解作用, 通过产生抗生素达到抑制病原菌生长^[6]。芽孢杆菌在植物病害的生物防治中发挥着非常重要的作用, 其产生的代谢物质具有广谱抗菌作用^[7], 同时芽孢杆菌是土壤和植物微生态的微生物优势种群, 提高作物耐热、耐冷的抗逆能力和抗菌防病作用^[8-9]。微生物农药的活性物质多为生物活体, 一般受环境因素(温度、湿度)的影响较大, 因此药效发挥缓慢, 表现出不稳定性, 在田间使用时不能及时的发挥优势, 从而出现防治不理想的尴尬局面。本试验利用蜡质芽孢杆菌AT31产品对根结线虫防治的研究, 探讨微生物农药提高药效、降低成本的使用技术。

1 材料与方法

1.1 供试药剂 蜡质芽孢杆菌10亿CFU/mL悬浮剂(南京农业大学研制蜡质芽孢杆菌AT31, 新沂中凯农用化工有限公司生产“线灭”产品); 解淀粉酶芽孢杆菌发酵液(淮阴师范学院李师默老师提供); 伯克氏杆菌2亿/g(山东省科学院生物研究所研制杨合同研究员提供); 芽孢杆菌

液体(南京农大生物源农药创制有限公司生产“宁盾”产品); 噻唑磷10%颗粒剂(济南约克农化有限公司生产); 阿维菌素1.8%乳油(新沂中凯农用化工有限公司生产)。

1.2 供试线虫^[10] 将田间采回的黄瓜病株根系用自来水洗去泥土, 加少量水用豆浆机打碎后, 加入高渗蔗糖溶液(494g/L)混匀后经2 000r/min离心3min, 收集上清液3次, 50目分离筛去除残渣, 用500目和800目分离筛反复清洗, 收集500目筛上卵和大龄幼虫和800目筛上2龄幼虫。

将500目分离筛收集到的卵和大龄幼虫, 在解剖镜下观察测定, 不计虫数, 只计卵数, 加无菌水稀释制备成1 000粒/mL的悬浮液备用; 将800目分离筛收集到的2龄幼虫, 在解剖镜下观察测定虫数, 加无菌水稀释制备成1 000条/mL的悬浮液备用。

1.3 蜡质芽孢杆菌AT31产品的盆栽药效试验 黄瓜室内营养钵育苗, 待2~3片真叶期移栽至直径为25cm的盆钵中(沙壤土:有机质:腐熟鸡粪=2:2:1体积混匀)。苗移栽3d后, 将蜡质芽孢杆菌AT31设置4个浓度梯度处理A1、A2、A3、A4, 分别为15、30、60、120倍; 蜡质芽孢杆菌AT31与阿维菌素1.8%复合剂设置4个处理B1、B2、B3、B4, 即在蜡质芽孢杆菌AT31的15、30、60、120倍液中各加500倍的阿维菌素1.8%; 解淀粉酶芽孢杆菌设置4个浓度梯度处理C1、C2、C3、C4, 分别为15、30、60、120倍; 阿维菌素1.8%500倍液为1个处理D, 无菌水为空白对照(CK), 共14个处理, 每处理3重复, 每重复10株, 灌根生长良好的黄瓜幼苗, 30mL/盆。

为了充分模拟线虫田间发生情况, 灌根处理2d后, 将线虫和卵接种到黄瓜的根部(根周围插3小孔滴注虫和卵的悬浮液, 2龄幼虫1 000条/株, 卵3 000粒/株)。在育苗温室培养2月后缓慢取出黄瓜植株根系, 调查根结发病情况, 记

录数据。

1.4 蜡质芽孢杆菌产品的二次发酵液检测^[11] 将蜡质芽孢杆菌AT31产品按照10%的接种量接于初始发酵培养基中,在20~35℃温室大棚中,用鱼缸鼓泡气于培养基中使其充分发酵产孢,设3个重复。将上述发酵液稀释至 10^5 ~ 10^7 ,然后各取10 μ L点于LB平板上,每个浓度4个重复,每隔12h计算活菌数1次。将所取发酵液用80℃水浴10min后按照活菌检测方法点板检测芽孢。

1.5 蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液盆栽药效试验 试验设计同1.3,药剂处理为蜡质芽孢杆菌AT31产品60、150L/hm²,二次发酵液150、300、450、600L/hm²,噻唑磷10%30kg/hm²为化学药剂对照,清水为空白对照,共8个处理,每处理3次重复,每重复12株。其他条件均不变。

1.6 蜡质芽孢杆菌AT31产品二次发酵液的大棚人工接种药效试验 试验在新沂市经济技术开发区新沂中凯农用化工有限公司生物实验大棚,沙土两合土,试验前每667.7m²施入腐熟鸡粪15m³,深翻25cm。2014年2月24日黄瓜室内催芽育苗,3月27日移栽定植。试验设立7个处理组,分别为噻唑磷10%颗粒剂30kg/hm²、蜡质芽孢杆菌AT31产品150L/hm²、蜡质芽孢杆菌AT31二次发酵液450L/hm²、阿维菌素1.8%乳油15L/hm²、伯克氏杆菌30kg/hm²、芽孢杆菌(宁盾)150L/hm²、清水对照,每处理3重复,每重复为随机抽取移栽好黄瓜苗的垄,每垄2.5m²为一小区,每小区24株。

为了充分模拟线虫田间发生情况,药剂灌根处理1d后,药剂处理和空白对照接种线虫和卵,每株2龄幼虫1000头、卵3000粒,在温度25~30℃,相对湿度 $\geq 40\%$,培养8周后缓慢取出植株,用清水清洗后调查结果。

1.7 调查方法及数据分析 根据根结线虫病情指数分级标准,调查黄瓜根部根结发病情况,整理后分析结果,计算出发病率、病情指数、防治效果等数据。

蔬菜根结线虫病情指数分级标准:0级 根部

正常无病;1级 根部发生线虫根结部分占根部的1/10以下;2级 发生线虫根结部分占根部的1/10~1/4;3级 发生线虫根结部分占根部的1/4~1/2;4级 发生线虫根结部分占根部的1/2~3/4;5级 发生线虫根结部分占根部的3/4以上。

$$\text{病情指数(根结指数)} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对应级别数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级别数}} \times 100\%$$

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

所有数据采用Excel和DPS7.05版软件进行方差分析,并采用邓肯氏新复极差(DMRT)法进行各处理间的差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度芽孢杆菌产品防治根结线虫效果 从2个月后的试验结果来看(表1),蜡质芽孢杆菌AT31单剂与其添加阿维菌素1.8%500倍液的混合剂的15倍液处理组的病情指数0.32、0.375,显著低于其他各处理组的病情指数,阿维菌素1.8%处理组病情指数最高。蜡质芽孢杆菌AT31与解淀粉酶芽孢杆菌处理组对线虫防治均有一定的作用,蜡质芽孢杆菌AT31单剂15倍液防治效果高于混合剂,单剂防治效果为55.69%,接近60%,大于混合剂的48.07%和解淀粉酶芽孢杆菌处理中最高防治效果37.69%,建议蜡质芽孢杆菌AT31田间使用时不与阿维菌素制剂混合使用。在蜡质芽孢杆菌AT31单剂与混合剂中,高浓度防治效果明显高于低浓度的防治效果,单剂较低浓度时,发病重的处理组防治效果很不理想,而化学药剂阿维菌素在防治线虫持效性上表现非常差。因此在田间使用蜡质芽孢杆菌AT31时要达到一定的剂量才能发挥其防治效果。

2.2 二次发酵液检测结果 蜡质芽孢杆菌AT31产品二次发酵放在温室大棚中进行,每隔12h对发酵液中菌体数和芽孢数进行测定。在0~48h时间段内,菌体数和芽孢数随时间呈对数增长,菌体数>芽孢数。在48h达到高峰期,菌体数 1.5×10^9 CFU/mL,芽孢数 1.4×10^9 CFU/mL。48h以后略有降低,但变化不明显,72h时菌体数和芽孢数均在 1.3×10^9 CFU/mL以上。通过二次发酵可以达到产品原液的菌数量。

表1 蜡质芽孢杆菌AT31产品对根结线虫的温室防治效果

处理	处理株数	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
A1	30	100	0.375 0d	48.08
A2	30	100	0.600 0bc	16.92
A3	30	100	0.666 7b	7.68
A4	30	100	0.800 0a	—
B1	30	100	0.320 0d	55.69
B2	30	80	0.500 0c	30.76
B3	30	88.89	0.611 1bc	15.38
B4	30	100	0.592 6bc	17.95
C1	30	100	0.666 7b	7.68
C2	30	100	0.700 0ab	3.07
C3	30	70	0.450 0cd	37.69
C4	30	100	0.522 7c	27.62
D	30	100	0.857 1a	—
CK	30	100	0.722 2ab	—

注：表中不同小写字母表示0.05水平上差异显著，下同。

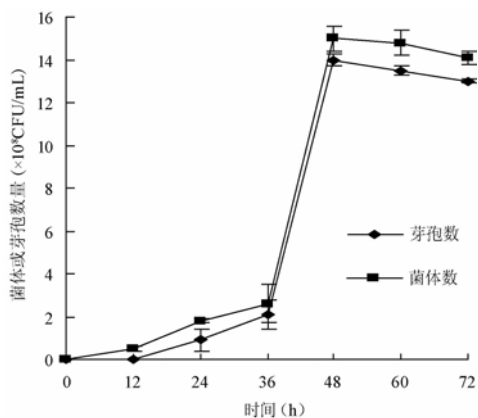


图1 蜡质芽孢杆菌AT31产品二次发酵液中菌体及芽孢数随时间变化情况

2.3 二次发酵液盆栽试验结果 室内盆栽试验结果表明 (表2), 各药剂处理对根结线虫均有一定的防治效果。蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液的不同使用浓度防治效果差异明显, 随着使用剂量的增加, 防治效果明显提高, 当使用剂量为450L/hm²时, 药后60d防治效果

为66.67%, 同蜡质芽孢杆菌AT31产品原液150L/hm²防治效果65.36%、噻唑膦10%颗粒剂30kg/hm²防治效果65.5%差异不显著 (P>0.5)。因此蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液田间大剂量的使用条件下, 防治效果较好, 使用剂量450L/hm²为宜。

2.4 田间大棚接种试验结果 大棚试验结果显示 (表3), 蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液在大剂量使用时防治效果达到73.46%, 显著高于阿维菌素1.8%乳油和伯克氏杆菌, 略高于蜡质芽孢杆菌AT31产品原液的70.54%, 与噻唑膦10%颗粒剂74.32%的防治效果相近。噻唑膦10%颗粒剂、蜡质芽孢杆菌AT31产品及其二次发酵液对根结线虫均有较好的防治效果, 三者之间防治效果差异不显著。蜡质芽孢杆菌AT31产品在田间使用前通过二次发酵的方法能够达到对根结线虫的防治效果, 以及解决用药成本问题, 同时表现出了防治持久性的优势。

表2 蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液对根结线虫的温室防治效果

处理/施药剂量	处理株数	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
蜡质芽孢杆菌AT31 150L/hm ²	36	100	0.315 6d	65.36
蜡质芽孢杆菌AT31 60L/hm ²	36	100	0.388 9cd	57.32
二次发酵液600L/hm ²	36	100	0.277 8e	69.51
二次发酵液450L/hm ²	36	100	0.303 7de	66.67
二次发酵液300L/hm ²	36	100	0.392 6cd	56.91
二次发酵液150L/hm ²	36	100	0.438 9c	51.83
二次发酵液60L/hm ²	36	100	0.566 4b	37.83
噻唑膦10%颗粒剂30kg/hm ²	36	88.89	0.314 3d	65.50
CK	36	100	0.911 1a	—

表3 不同药剂处理对根结线虫的田间防治效果

处理/施药剂量	处理株数	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
蜡质芽孢杆菌AT31 150L/hm ²	72	59.92	0.157 9cd	70.54
二次发酵液450L/hm ²	72	70.83	0.215 4c	73.46
噻唑膦10%颗粒剂30kg/hm ²	72	77.78	0.208 4c	74.32
宁盾150L/hm ²	72	77.83	0.265 0bc	67.34
阿维菌素1.8%乳油15L/hm ²	72	90.52	0.288 5b	64.45
伯克氏杆菌30kg/hm ²	72	87.5	0.325 4b	59.90
CK	72	100	0.811 5a	—

3 讨论

蜡质芽孢杆菌的生长萌发需要一定的环境条件,如温度、湿度、pH和营养物质等^[11]。芽孢杆菌的田间使用剂型、剂量、施用方法、目标病害的状态等因素对防效也有一定的影响^[12]。在微生物农药防治病虫害应用中,菌的释放密度是关键因素,通过较大的使用量或短期内能够迅速繁殖扩大数量,保证益生菌的种群优势,则更有利于控制流行病的发生^[13]。从蜡质芽孢杆菌AT31产品不同浓度梯度的盆栽药效试验可以看出,高浓度处理对根结线虫的防治效果明显高于低浓度处理,因此在防治根结线虫时菌的释放量至关重要,高剂量的田间使用可以提高防治效果,但却加大了用药成本。

蜡质芽孢杆菌AT31产品进行二次发酵后,

菌体和芽孢含量均在10亿CFU/mL以上。防治根结线虫盆栽试验使用剂量为450L/hm²时,防治效果达到66.67%,略高于产品原液150L/hm²和噻唑膦10%颗粒剂30kg/hm²的防治效果65.36%、65.5%。大棚试验结果同样验证了蜡质芽孢杆菌AT31产品的二次发酵液对线虫的较好防治效果73.46%,防治效果与当前市场上防治根结线虫的最好的化学药剂噻唑膦10%颗粒剂相近。在防治根结线虫中,与阿维菌素对比,蜡质芽孢杆菌表现出了防治持久性的优势。

蜡质芽孢杆菌AT31产品在使用前通过二次发酵的方法,打破了芽孢休眠状态,经过大量繁殖增数,避免了不能及时占位的缺点,提高了防治效果和改善了土壤微环境,还可以解决储存、价格、使用技术等一系列的问题^[14]。

参考文献

- [1] 段玉玺. 植物线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] Koenning Stephen R., Wrather J. Allen, Kirkpatrick Terrence L., et al. Plant-Parasitic Nematodes Attacking Cotton in the United States: Old and Emerging Production Challenges[J]. Plant Disease, 2004, 88 (2): 100-113.
- [3] 王宏宝, 赵桂东, 刘伟中, 等. 不同药剂对黄瓜根结线虫病防治效果研究[J]. 福建农业学报, 2012, 27 (11): 1242-1245, 2012.
- [4] 艾辉建, 刘志明, 黄金玲, 等. 几种杀线剂对南方根结线虫的田间药效试验[J]. 南方农业学报, 2012, 43 (7): 961-964.
- [5] 万景旺, 邵颖, 朱华, 等. 生防菌 Jdm2 与生物源农药混用防治黄瓜根结线虫病的效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (4): 108-110.
- [6] 黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 等. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果[J]. 生态学报, 2014, 34 (10): 2559-2566.
- [7] 易龙, 张亚, 廖晓兰, 等. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. 农药, 2013, 52 (3): 162-164.
- [8] Niranjan Raj S., Chaluvvaraju G., Amruthesh K.N., et al. Induction of growth promotion and resistance against downy mildew on pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by rhizobacteria[J]. Plant Disease, 2003, 87 (4): 380-384.
- [9] Dutta S., Mishra A.K., Kumar B.S. Dileep. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40 (2): 452-461.
- [10] 张绍松, 李成云, 周晓罡, 等. 番茄根结线虫分离和苗期接种方法研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21 (3): 659-663.
- [11] 张文芝, 王云鹏, 刘红霞, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2010.
- [12] 张荣胜, 陈思宇, 王晓宇, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 防治水稻细菌性条斑病应用技术研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29 (4): 595-600.
- [13] 杨威, 刘苏冈, 郭坚华. 细菌定殖能力与其生物防治功能相关性研究进展[J]. 中国生物防治, 2010, 26: 90-94.
- [14] 袁善奎, 王以燕. 我国微生物农药标准制定现状[J]. 农药, 2013, 52 (8): 612-614.

环保组织希望WHO对草甘膦采取行动

一个由欧盟和美国环保组织组成的联盟要求联合国世卫组织应依据国际癌症研究机构(IARC)的最新结论迅速做出反应, 建立新的草甘膦残留食品安全标准。由自然资源保护委员会(NRDC)所领导的该联盟还警告, 在负责研究修订草甘膦安全标准的专家组成员中可能有几位专家片面支持农药产业。

FAO/WHO农药残留联席会议(JMPR)已经成立了一个专家组, 重新审定草甘膦、马拉硫磷、二嗪磷的安全标准。今年初, IARC宣布这三种农药有可能会致癌, 但是争议最大的是草甘膦。孟山都以及其它几个主要农业集团, 斥

责IARC的分类毫无道理且缺乏合理的科学依据。

环保组织声称, 8名JMPR专家中有3位和孟山都及其它农药利益集团, 尤其是和工业界支持的研究机构——国际生命科学研究所, 存在“资金和业务上的联系”。“因此, 鉴于当前专家组的构成, 我们极其关注其是否具有提供客观公正的风险评估的能力”, 该联盟在6月16日致信给WHO和FAO高级官员时声称, “我们强烈要求WHO确保专家组成员无任何利益冲突和其他偏见, 以免对专家组的工作造成不当影响”。

(赵尔成 译自《Agrow》No.20150622)